

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ana Hladnik**

**Tangencijalna migracija stanica  
telencefalona čovjeka i majmuna u  
ranom fetalnom razdoblju**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2016.**



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ana Hladnik**

**Tangencijalna migracija stanica  
telencefalona čovjeka i majmuna u  
ranom fetalnom razdoblju**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2016.**

Disertacija je izrađena u Laboratoriju za neuromorfometriju Odsjeka za razvojnu neuroznanost Hrvatskog instituta za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Zdravko Petanjek

Prije svega zahvalnost za ovu disertaciju i moj znanstveni rad dugujem mentoru prof. dr. sc. Zdravku Petanjeku. Hvala na nesebičnoj podršci, strpljenju, pomoći i svakoj riječi tijekom svih godina zajedničkog rada. Nadam se da ću tvoje povjerenje opravdati u godinama koje slijede.

Zahvaljujem prijateljima i suradnicima iz Laboratorija za neuromorfometriju i s Katedre za anatomiju i kliničku anatomiju. Prof. dr. sc. Ivanu Vinteru koji me stručno i nastavno usmjeravao od mog prvog radnog dana na Anatomiji, zahvaljujem na svim savjetima te podršci i pomoći. Akademiku Ivici Kostoviću i prof. dr. sc. Monique Esclapez koji su mi omogućili pristup histološkim zbirkama, zahvaljujem na ukazanom povjerenju.

I na kraju, najveću zahvalnost dugujem mojoj obitelji bez čije bezuvjetne ljubavi i svakodnevnih odricanja ova disertacija nikada ne bi bila gotova. Mami i tati koji su uvijek vjerovali u moj uspjeh i bili velika podrška tijekom mog školovanja, a zajedno s mojim sestrama uskakali kad god mi je trebala pomoć. Baki i didi koji su se radovali svakom mom uspjehu, ali nažalost nisu dočekali ovu disertaciju. I na kraju hvala Arnu, Tonki i Franki na bezgraničnoj ljubavi te strpljivosti i razumijevanju zbog mojih čestih odsutnosti duhom i tijelom.

## Financirano sredstvima Hrvatske zaklade za znanost



**IP-11-2013-5943**

**COGNITIVECIRCUIT**

Eksperimentalni postupci, analiza preparata i troškovi izrade ove disertacije financirani su sredstvima Hrvatske zaklade za znanost, istraživački projekt HRZZ5943 „Neuralna osnova viših kognitivnih funkcija“, voditelj prof.dr.sc. Zdravko Petanjek, koji se provodi na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD I SVRHA RADA</b>	1
1.1 ORGANIZACIJA ODRASLOG TELENCEFALONA	3
1.1.1 Podjela telencefalona	3
1.1.2 Neuroni telencefalona	4
1.1.2.1 Neuroni kore velikoga mozga	6
1.2. PRENATALNI RAZVOJ MOZGA U ČOVJEKA I MAJMUNA	8
1.2.1 MORFOGENEZA	11
1.2.1.1 Razvoj mozga prema Carnegie stadijima	11
1.2.1.2 Razvoj i podjela fetalnog telencefalona	13
1.2.2 HISTOGENEZA	18
1.2.2.1 Slojevi stijenke telencefalona prije stvaranja kortikalne ploče	21
1.2.2.1.1 Proliferativne zone	21
1.2.2.1.2 Rana neokortikalna osnova: preteča kortikalne ploče (preplate)	22
1.2.2.2 Slojevi stijenke telencefalona nakon stvaranja kortikalne ploče	25
1.2.2.2.1 Ventrikularna i subventrikularna zona	25
1.2.2.2.2 Intermedijalna zona	26
1.2.2.2.3 Subplate zona	26
1.2.2.2.4 Kortikalna ploča	27
1.2.2.2.5 Marginalna zona	29
1.2.3 MIGRACIJA	31
1.2.3.1 Radijalna migracija	31
1.2.3.2 Tangencijalna migracija	34
1.3 PROMJENE U ORGANIZACIJI MREŽE KORTIKALNIH GABA-ergičkih NEURONA	36
1.3.1 Molekularna obilježja i klasifikacija GABA-ergičkih neurona	36
1.3.2 Porast broja kortikalnih GABA-ergičkih neurona kod primata	38
1.3.3 Promjene u porijeklu i migraciji kortikalnih GABA-ergičkih neurona kod primata	41
1.3.3.1 Produkcija i migracija GABA-ergičkih neurona tijekom ranog fetalnog razdoblja	41
1.3.3.2 Produkcija i migracija GABA-ergičkih neurona tijekom srednjeg i kasnog fetalnog razdoblja	43
<b>2. HIPOTEZA</b>	49
<b>3. CILJEVI RADA</b>	49
3.1 Opći cilj	49
3.2 Specifični ciljevi	49

<b>4. MATERIJALI I METODE</b>	<b>51</b>
4.1 UZORAK	52
4.1.1 Ljudsko tkivo	52
4.1.2 Majmunsko tkivo	53
4.2 METODE	54
4.2.1 Klasične neurohistološke metode	54
4.2.1.1 Golgi metoda	54
4.2.1.2 Nissl metoda	55
4.2.2 Imunohistokemijske metode	56
4.2.2.1 Jednostruko imunohistokemijsko bojenje	58
4.2.2.2 Dvostruko imunohistokemijsko bojenje	59
4.2.3. Digitalna rekonstrukcija i kvalitativna analiza histoloških rezova	60
<b>5. REZULTATI</b>	<b>61</b>
5.1 STADIJ I U MAJMUNA (E44-E50) I ČOVJEKA (7-10PCW): PRIJELAZ EMBRIONALNOG U RANO FETALNO RAZDOBLJE	62
5.1.1 Tangencijalna migracija u čovjeka između 7. i 10. tjedna nakon začeća	62
5.1.2 Tangencijalna migracija u majmuna između 46. i 48. embrionalnog dana	85
5.1.2.1 Laminarna organizacija telencefalona i zone stvaranja tangencijalno migrirajućih stanica	85
5.1.2.2 Ekspresija kalcij vežućih proteina u proliferativnim zonama i tangencijalno migrirajućim stanicama	108
5.1.2.3 Porijeklo i putevi migracije GABA-ergičkih neurona	130
5.2 STADIJ II U MAJMUNA (E50-E70) I ČOVJEKA (11-14PCW): RANO FETALNO RAZDOBLJE	161
5.2.1 Tangencijalna migracija u majmuna između 52. i 56. embrionalnog dana	161
5.2.1.1 Laminarna organizacija telencefalona i zone stvaranja tangencijalno migrirajućih stanica	161
5.2.1.2 Porijeklo i putevi migracije GABA-ergičkih neurona	182
5.2.1.3 Ekspresija kalcij vežućih proteina u proliferativnim zonama i putevima tangencijalne migracije	199
5.2.2 Tangencijalna migracije u čovjeka između 11. i 14. tjedna nakon začeća	217
5.2.3 Tangencijalna migracije u majmuna između 64. i 68. embrionalnog dana	237
5.3 STADIJ III U MAJUMUNA (E70-E90) I ČOVJEKA (15-17PCW): SREDNJE FETALNO RAZDOBLJE	266
5.3.1 Tangencijalna migracija u čovjeka između 15. i 17. tjedana nakon začeća	266
5.3.2 Tangencijalna migracija u majmuna između 75. i 90. embrionalnog dana	273
5.3.3 Marginalna zona kao put tangencijalne migracije	294
5.3.4 Produžena proliferacija GABA-ergičkih neurona u majmuna i čovjeka	307

<b>6. RASPRAVA</b>	311
6.1 METODOLOŠKI OSVRT NA ISTRAŽIVANJE	311
6.1.1 GAD i Mash1 ekspresija kao biljeg u određivanju zona proliferacije i puteva migracije kortikalnih GABA-ergičkih neurona	312
6.1.2 Identifikacija zona proliferacije i puteva migracije različitih populacija kortikalnih GABA-ergičkih neurona	313
6.2 PORIJEKLO I PUTOVI MIGRACIJE GABA-ergičkih NEURONA TELENCEFALONA	315
6.2.1 Ganglijski brežuljak je najmasivniji izvor tangencijalno migrirajućih GABA-ergičkih neurona telencefalona: većina ovih neurona putuje u sastavu lateralnog migratornog snopa	315
6.2.2 Palijalne proliferativne zone postaju važan izvor GABA-ergičkih neurona tijekom srednjeg fetalnog razdoblja	316
6.2.3 Septalne proliferativne zone kao izvor GABA-ergičkih neurona koji migriraju kroz marginalnu zonu	318
6.2.4 GAD67 reaktivne proliferativne zone telencefalona kao izvor GABA-ergičkih neurona koji migriraju kroz marginalnu zonu i zonu ispod kortikalne ploče	319
6.2.5 Diencefaličke proliferativne zone kao izvor GABA-ergičkih neurona telencefalona	320
6.2.6 Proliferativne zone oko vrha temporalnog roga lateralnih moždanih klijetki kao važan izvor GABA-ergičkih neurona koji tijekom srednjeg fetalnog razdoblja migriraju u hipokampus i dalje prema marginalnoj zoni neopalijske	322
6.3 VREMENSKI I PROSTORNI OBRAZAC STVARANJA I MIGRACIJE RAZLIČITIH POPULACIJA GABA-ergičkih NEURONA	324
6.3.1 Porijeklo i odredište različitih populacija GABA-ergičkih neurona	324
6.3.2 Vrijeme stvaranja različitih populacija GABA-ergičkih neurona	326
6.4 TANGENCIJALNA MIGRACIJA ne-GABA-ergičkih NEURONA	328
6.4.1 Formiranje primordijalne kalretininske kortikalne ploče	328
6.4.2 Porijeklo i migracija neurona marginalne zone	331
6.4.3 Formiranje hipokampalne ploče i tangencijalna migracija u području hipokampusa	333
6.5. ORGANIZACIJA RANE FETALNE NEURALNE MREŽE U KORTEKSU MAJMUNA I ČOVJEKA	334
6.5.1 Struktura i nastanak funkcionalnih krugova marginalne zone	334
6.5.2 Pojava diferenciranih neurona u intermedijalnoj zoni i primordijalni sloj pod pločom kao koridor migracije	335
<b>7. ZAKLJUČCI</b>	337
<b>8. SAŽETAK</b>	339
<b>9. SUMMARY</b>	340
<b>10. POPIS LITERATURE</b>	341
<b>11. ŽIVOTOPIS</b>	356

Popis kratica:

AchE	acetilkolinesteraza	GD	gyrus dentatus
Acc	nucleus accumbens	GE	ganglijski brežuljak (engl. <i>ganglionic eminence</i> )
Amig	amigdala	Hipp	hippocampus
BT	bazalni telencefalon	Hyp	hypothalamus
CA	cornu Amonis	IZ	intermedijalna zona
CaBP	kalcij vežući protein (engl. <i>calcium binding protein</i> )	LGE	lateralni ganglijski brežuljak
Caud	nucleus caudatus	LV	lateralna klijetka
CB	kalbindin	MGE	medijalni ganglijski brežuljak
CC	corpus calosum	MZ	marginalna zona
CGE	kaudalni ganglijski brežuljak	NeuN	neuralni nuklearni antigen
CH	kortikalni hem (engl. <i>cortical hem</i> )	OB	olfaktorni bulbus
ChP	koroidni splet (engl. <i>choroid plexus</i> )	OV	paleokortikalni ventrikul
CP	kortikalna ploča	PCW	tjedan nakon začeca (engl. <i>postconceptional week</i> )
CR	kalretinin	POA	preoptičko područje (engl. <i>preoptic area</i> )
CRL	duljina tjeme zadak (engl. <i>crown rump length</i> )	PP	preplate
D	diencefalon	Put	putamen
dHipp	dorzalni hipokampus	PV	parvalbumin
dLGE	dorzalni dio lateralnog ganglijskog brežuljka	SE	septalni brežuljak (engl. <i>septal eminence</i> )
E	embrionalni dan (engl. <i>embryonic day</i> )	Sept	septum
Epi	epithalamus	SGL	subpialni granularni sloj (engl. <i>subpial granular layer</i> )
fx	fornix	SOM	somatostatin
GABA	gamma-amino-maslačna kiselina	SP	subplate zona
GAD 65	glutamat-dekarboksilaza izoforma 65	SVZ	subventrikularna zona
GAD 67	glutamat-dekarboksilaza izoforma 67	Th	thalamus
		TRN	talamička retikularna jezgra
		V3	treća moždana komora
		vHipp	ventralni hipokampus
		VZ	ventrikularna zona

## 1. UVOD I SVRHA RADA

Većina spoznaja o razvoju kore velikoga mozga u sisavaca temelji se na istraživanjima provedenim u glodavaca (Rakic, 2006, O'Leary i sur., 2007, Preuss, 2009, Rakic, 2009, Judaš, 2011). Ekonomičnost i jednostavnost rada na malim laboratorijskim životinjama (miš i štakor) pokazala su se ključnim za detaljno razumijevanje iznimno složenih mehanizama razvoja moždane kore (Rakic, 2000) jer su osnovni principi razvoja zajednički za sve sisavce (Rakic i sur., 2009a). No ipak, kod čovjeka su uočene značajne razlike u razvoju mozga u odnosu na male eksperimentalne životinje (Rakic, 2009, Judaš, 2011). Tako subplate zona postaje dominantna razvojna zona kojoj je uloga usmjeriti urastanje aksona, pozicioniranje neurona i uspostava prvih funkcionalnih neuralnih krugova (Kostović i Rakic, 1990). U fetusa čovjeka javlja se vanjska subventrikularna zona koja je glavni proliferativni sloj (Smart i sur., 2002, Zecevic i sur., 2005), a neuroni masovnije koriste neke puteve migracije da oblikuju novi podsloj, primjerice subpialni zrnati sloj. Već je i samo nastajanje kortikalne ploče složenije (Bystron i sur., 2008), a čovjek ima i više vrsta ranih Cajal-Retziusovih stanica (Meyer, 2010), kao i daleko više vrsta progenitora (Rakic, 2003a, b). Tijekom razvoja u mozgu čovjeka uočene su jedinstvene fetalne strukture poput ganglio-talamičkog tijela (Letinic i Kostović, 1997), subputaminalne jezgre (Šimić i sur., 1999), intrakalozalnih i subkalozalnih neurona (Kostović i Judaš, 2002, Jovanov-Milošević i sur., 2010), a postoje i jedinstvena obilježja organizacije strijatum i amigdala (Nikolic i Kostović, 1986, Letinic i Kostović, 1996b, Vukšić i sur., 2008) te periretikularne talamičke jezgre (Letinic i Kostović, 1996a).

Kod primata je posebno upečatljivo usložnjavanje GABA-ergičke komponente kortikalne neuralne mreže. Dok u neokorteksu glodavaca nema više od 15% GABA-ergičkih neurona, kod primata oni čine najmanje 20% od ukupnog broja neurona (Hendry i sur., 1987, del Rio i DeFelipe, 1996, Gabbott i Bacon, 1996b, Jones, 2009). Ovo povećanje udjela vezano je uz povećanje subpopulacije GABA-ergičkih neurona koji izražavaju kalretinin. Njihov se udio povećava tri puta te oni u primata čine oko polovicu populacije GABA-ergičkih neurona. Promjene u organizaciji GABA-ergičke neuralne mreže vezane su uz značajne promjene u razvojnim događanjima. Dok se kod glodavaca gotovo svi kortikalni GABA-ergički neuroni stvaraju u proliferativnim zonama ventralnog telencefalona (subpalijum - ganglijski brežuljak), i zatim tangencijalno migriraju u palijum (korteks i hipokampus), kod majmuna i čovjeka se tijekom srednjeg fetalnog razdoblja GABA-ergički neuroni počinju masovno stvarati i u dorzalnim (palijalnim-kortikalnim) proliferativnim zonama (Letinic i sur., 2002, Rakic i Zecevic, 2003b, Petanjek i sur., 2009a, Yu i Zecevic, 2011, Zecevic i sur., 2011). Većina razvojnih osobitosti u prednjem mozgu primata posebno je izražena tijekom srednjeg fetalnog razdoblja i prepoznata kao ključan čimbenik usložnjavanja kortikalne



neuralne mreže. Iako je za očekivati kako prije toga razdoblja dominiraju razvojni procesi koji su zajednički onima u glodavaca, ipak su opisane neke važne razlike. Tako u majmuna i čovjeka već prije potpunog zatvaranja neuralne cijevi postoji masivna tangencijalna migracija u buduću osnovu telencefalona (Bystron i sur., 2006) pa je i stanična organizacija primordijalne marginalne zone značajno složenija. Kako GABA-ergički neuroni uspostavljaju prve funkcionalne krugove telencefalona (Khazipov i sur., 2001) može se pretpostaviti kako upravo oni čine većinu neuralne populacije primordijalne marginalne zone. Preostali dio čine neuroni kod kojih nije identificiran neurotransmiter, ali se mogu prepoznati po tome što izražavaju reelin i/ili kalretinin (Meyer i sur., 2000, Meyer i sur., 2002, Tissir i Goffinet, 2003). Ovi neuroni oblikuju kalretininsku ploču i nemaju jasno identificirano mjesto porijekla, ali se kao najvjerojatniji izvor ovih neurona čine strukture medijalnog i bazalnog dijela telencefalona. Kortikalni GABA-ergički neuroni tijekom prve trećine trudnoće dolaze gotovo isključivo iz ganglijskog brežuljka i ne stvaraju se u proliferativnim zonama palijuma kao što je slučaj tijekom srednje trećine trudnoće (Letinic i sur., 2002, Petanjek i sur., 2009b, Zecevic i sur., 2011). Kako se lateralni migratorni snop, kojega tvore migratorne stanice koje napuštaju ganglijski brežuljak i kreću prema palijumu, počinje formirati tek tijekom ranog fetalnog razdoblja, GABA-ergički neuroni koji se nalaze u osnovi telencefalona već tijekom embrionalnog i na samom početku fetalnog razdoblja najvjerojatnije potječu iz drugih proliferativnih područja.

Stoga je pretpostavka ovog istraživanja da u formiranju ranih fetalnih krugova sudjeluje veći broj neuralnih populacija koje se stvaraju u različitim proliferativnim područjima te da svaka populacija ima i specifičan put tangencijalne migracije prema stijenci telencefalona. Očekuje se da su izvori ranih populacija fetalnih neurona proliferativne zone preoptičkog područja, septuma, paleokortikalnog ventrikula, olfaktorne plakode kao i dijelova medijalnog telencefaličkog zida gdje se spajaju neuroepitel i epitel koroidnog spleta, a neki možda nastaju čak i iz samog koroidnog spleta. Također, moguće je i da u formiranju ranih krugova telencefalona sudjeluju neuroni koji potječu od diencefaličkih proliferativnih zona. Sustavna analiza distribucije tangencijalno migrirajućih neurona i analiza svojstava proliferativnih zona tijekom ranog fetalnog razdoblja u telencefalonu majmuna i čovjeka pokazala bi složenost u porijeklu različitih vrsta neurona koji formiraju ranu neuralnu mrežu. Usporedba podataka dobivenih u ovim istraživanju s rezultatima dobivenim na glodavacima omogućit će definiranje specifičnosti razvoja kod primata te predložiti mjesta porijekla i puteve tangencijalne migracije različitih populacija neurona. Kako brojni neurološki i psihijatrijski poremećaji imaju razvojno porijeklo, poznavanje specifičnih obilježja i mehanizama koji omogućuju oblikovanje složene neuralne mreže kore velikoga mozga čovjeka ključno je za razumijevanje patofizioloških mehanizama ovih poremećaja (Rakic, 2006, Judaš, 2011).

## 1.1 ORGANIZACIJA ODRASLOG TELENCEFALONA

Telencefalon, koji obuhvaća moždanu koru, olfaktorni bulbus, hipokampus, bazalne ganglije i amigdala najsloženiji je i evolucijski najrazvijeniji dio ljudskog mozga. On je sjedište viših spoznajnih funkcija, uključujući pohranu i dohvat memorije, integraciju i obradu senzornih i motornih funkcija, kompleksnu modulaciju afektivnog odgovora. Telencefalon također upravlja našim kreativnim impulsima, omogućuje donošenje racionalnih odluka i planiranje budućnosti (Corbin i Butt, 2011).

### 1.1.1 Podjela telencefalona

Telencefalon izgrađuju dvije velike polutke i mali skriveni septalni dio. Najveći dio površine telencefalona, a ujedno i velikog mozga, prekriva moždana kora (*cortex cerebri*). Moždanu koru izgrađuju dvije osnovne vrste neurona, projekcijski neuroni i neuroni lokalnih neuronskih krugova (interneuroni). Ispod moždane kore nalazi se bijela tvar (*substantia alba cerebri*) u čijoj su dubini smještene moždane komore i uz njih velike nakupine sive tvari.

Temeljem razvojnih kriterija, unutrašnje slojevite građe i topografije svaka polutka telencefalona može se podijeliti u tri temeljna područja: lateralno, limbičko i mediobazalno područje (Judaš i Kostović, 1997).

Konveksna (lateralna) strana velikog mozga, lateralni dio baze i dio medijalne strane velikog mozga dorzalno od limbičkog područja čini lateralni, najveći dio telencefalona. Izgrađuju ga frontalni, temporalni, parijetalni i okcipitalni režanj s vijugama i brazdama. Moždanu koru lateralnog područja telencefalona čini šesteroslojni, filogenetski noviji neokorteks, a pripadajuću bijelu tvar asocijativni putevi, projekcijski putevi (*corona radiata*) i komisuralni putevi (*corpus callosum*). Osim kore mozga, neuroni su smješteni i subkortikalno, od kojih je najveća struktura *corpus striatum* kojega čine *nucleus caudatus*, *putamen* i *nucleus accumbens*. Uz striatum, brojne manje subkortikalne jezgre smještene su na bazalnim i septalnim dijelovima telencefalona.

Na medijalnoj strani hemisfera, oko korpusa kalozuma i diencefalona, vidljivo je limbičko područje telencefalona. Moždana kora limbičkog područja jest limbički korteks, koji se prema građi dijeli na troslojni arhikorteks i prijelazni mezokorteks. Kako makroskopski limbički korteks djeluje kao režanj, opisuje se kao rubni režanj, *lobus limbicus*. Pripadajuću bijelu tvar čine projekcijski putevi (*fornix*), asocijativno-projekcijski putevi (*cingulum*) i komisure (*commissura hippocampi* i dio *commissura anterior*). Amigdaloidna skupina jezgara definira se kao subkortikalna jezgra limbičkog područja, iako je jedan dio smješten na površini.

Najmanje područje je mediobazalno područje koje se na bazi mozga vidi lateralno i rostralno od hijazme i traktusa optikusa te je prekriveno vrhom temporalnog režnja. Rostro-medijalno prelazi u septalno i limbičko područje. Moždana kora mediobazalnog telencefalona je jednostavne dvoslojne građe, filogenetski najstariji paleokorteks, a pripadajuća bijela tvar je vrlo oskudna. Subkortikalna siva masa čini dio amigdaloidnog kompleksa i uklopljena je u *substantia innominata* koja se nalazi u dubini *substantia perforata anterior*. Na rostralnom kraju mediobazalnog telencefalona, neposredno rostralno od linije koja povezuje interventrikulari otvor i prednji rub hijazme smješteno je malo područje, *septum telencephali*. Dorzalni tanki dio je *septum pellucidum*, a ventralni zadebljani je *septum verum*. Jezgre septalnog područja nalaze se u području dna septuma (*nucleus septi lateralis*), u dubokom sloju paraterminalnog girusa (*nucleus septi medialis*), u dijagonalnom girusu (*nuclei diagonalis*) i u donjem produžetku nukleusa kaudatusa (*nucleus accumbens septi*).

Unutar telencefalona zasebno se opisuje i dio mozga, *rhinencephalon*, koji putem *tractus olfactorius* prima izravne niti iz *bulbus olfactorius* i povezan je s funkcijom njuha. U čovjeka ovaj dio zauzima vrlo malo područje na centralnom dijelu bazalne površine mozga.

### 1.1.2 Neuroni telencefalona

Neuroni središnjeg živčanog sustava u pravilu sintetiziraju jednu malu signalnu molekulu, aminokiselinu ili derivat aminokiseline (amini i kolini). Stoga se neuroni definiraju kao kolinergički, katekolaminergički (adrenergički, noradrenergički i dopaminergički) i serotoninergički, glutamatergički i GABA-ergički neuroni. Neke populacije neurona koje sintetiziraju glutamat, mogu sintetizirati i/ili aspartat, a GABA-ergički neuroni glicin. Histamin i taurin su također opisani u ovoj skupini neurotransmitera. Uz klasične neurotransmitere (male signalne molekule), neuroni mogu sintetizirati i sinaptički otpuštati peptide i proteine, kao što su neuropeptid Y (NPY), vazoaktivni intestinalni peptid (VIP), kolekistokinin, somatostatin, endorfin, encefalin (Judaš i Kostović, 1997).

Acetilkinolin je neurotransmiter preganglijskih aksona simpatičkog i parasimpatičkog sustava te postganglijskih aksona parasimpatičkog sustava, neurotransmiter motoneurona i neuromišićne sinapse, krupnih interneurona strijatuma, mnogih amakrinih stanica mrežnice, subpopulacije Golgijevih stanica kore malog mozga te jednog dijela pontocerebelarnih vlakana. No, acetilkinolin je neurotransmiter i osam specifičnih skupina neurona u mediobazalnom telencefalonu (Ch1 u medijalnoj septalnoj jezgri, Ch2 u *nucleus diagonalis pars verticalis*, Ch3 u *nucleus diagonalis pars horizontalis* i najveća skupina Ch4 u bazalnoj Meynertovoj jezgri, Ch5, Ch6 i Ch8 u tegmentumu moždanom deblu te Ch7 u medijalnoj habenularnoj jezgri). Ti acetilkolinski neuroni imaju važnu ulogu u moduliranju aktivnosti moždane kore i talamusa te procesima budnosti i spavanja, pozornosti, učenja i pamćenja.

Noradrenalinski i dopaminski (kateholaminski) te serotoninski neuroni čine monoaminsku skupinu neurona smještenu u moždanome deblu. Svi serotoninski neuroni (skupine B1-B9) su smješteni jedino u moždanom deblu u sklopu jezgara, *nuclei raphes*. I svi noradrenalinski neuroni (A1-A7) su smješteni u moždanom deblu, a dijele se u dvije skupine: skupina lateralnog tegmentuma (A1, A2, A5 i A7) koja aksone šalje poglavito u kralježničnu moždinu te sklop locus coeruleus (A4 i A6) koji aksone šalje poglavito u moždanu koru. No, dopaminski neuroni (A8-A16) su smješteni u mezencefalonu (A8-A10), u diencefalonu (A11-A14), u preoptičkom području (A15) i u njušnoj lukovici (A16) (Judaš i Kostović, 1997).

Peptidergički neuroni nalaze se u filogenetski starijim područjima mozga (u središnjoj sivoj tvari mezencefalona, u retikularnoj formaciji, hipotalamusu, olfaktornom bulbusu, habenularnim jezgrama, interpedunkularnoj jezgri, solitarnoj jezgri). Brojni peptidergički neuroni nalaze se i u kori mozga, talamusu, strijatumu i malom mozgu. Uloga različitih peptida još je uvijek nepoznata, ali se pretpostavlja djeluju kao kotransmiteri i imaju modulirajuću ulogu. Mnogi peptidi (kao vazoaktivni intestinalni polipeptid, somatostatin, kolekistokinin) nalaze se i u drugim organima.

Neurotransmiteri brze ekscitacije i inhibicije jesu glutamat i gama-amino-maslačna kiselina.

Glutamat je neurotransmiter piramidnih neurona moždane kore, pa time i svih asocijacijsko-komisurnih i projekcijskih vlakana moždane kore. Glutamat je neurotransmiter i talamokortikalnih aksona, primarnih aferentnih vlakana, fotoreceptora, bipolarnih i ganglijskih stanica mrežnice te aksona dugih uzlaznih osjetnih putova. Također je neurotransmiter projekcijskih neurona subtalamičke jezgre, zrnatih interneurona kore malog mozga kao i ekscitacijskih interneurona moždane kore (spinozne zvjezdaste stanice).

Gama-amino-maslačna kiselina je glavni inhibicijski neurotransmiter u cijelom živčanom sustavu, a u kralježničnoj moždini i donjem dijelu moždanog debla tu ulogu uz GABA-u ima i glicin. GABA je neurotransmiter većine interneurona središnjeg živčanog sustava (svih inhibicijskih interneurona moždane kore, strijatuma, diencefalona te moždanog debla i malog mozga). Većina tih neurona uz GABA-u sintetizira i barem još jedan neuropeptid (somatostatin, kolekistokinin, neuropeptid Y, tvar P, encefalin, galanin, vazoaktivni intestinalni polipeptid) ili kalcij vežući protein (kalbindin, kalretinin, parvalbumin). Također, GABA je i neurotransmiter većine projekcijskih neurona bazalnih ganglija i malog mozga: projekcijskih neurona kore malog mozga (Purkinjeove stanice), projekcijskih neurona SNr (*fibrae nigrotectales*, *fibrae nigrothalamicae*), projekcijskih neurona GPi i GPe (*fibrae pallidothalamicae*, *fibrae pallidosubthalamicae*) i projekcijskih neurona strijatuma te projekcijskih neurona retikularne jezgre talamusa, jedine jezgre talamusa što se ne projicira u moždanu koru nego u sve ostale jezgre talamusa (Judaš i Kostović, 1997).

### 1.1.2.1 Neuroni kore velikoga mozga

Neki od najviše istraživanih telencefaličkih neuralnih krugova jesu neuralni krugovi moždane kore. S obzirom na neurotransmiter koji sintetiziraju, dvije su osnovne skupine neurona kore velikoga mozga: ekscitacijski glutamatergički i inhibicijski GABA-ergički neuroni (Nieuwenhuys, 1994, DeFelipe i sur., 2002, DeFelipe i sur., 2013).

Glutamatergički ekscitacijski neuroni čine barem 70% svih kortikalnih neurona, a smješteni su poglavito u II., III. i V. sloju moždane kore. Za glutamatergičke neurone se najčešće koristi sinonim piramidni neuroni (DeFelipe i Farinas, 1992, Spruston, 2008, Thomson, 2010, Zaitsev i sur., 2012) jer većina ima čunjasto tijelo od čijeg se vrha prema pijalnoj površini penje apikalni dendrit, a od baze odlazi nekoliko bazalnih dendrita. Bazalni dendriti su kod pravilnih piramidnih neurona većinom ravnomjerne debljine i razgranjenja. Apikalni dendrit je značajno deblji od bazalnih dendrita i u najvećem broju slučajeva se grana u sloju I. Neke populacije piramidnih neurona imaju kraći apikalni dendrit koji ne doseže do pijalne površine. Na početnom dijelu apikalnog dendriti izlaze, pod relativno oštrom kutom, tanji kosi dendriti. Dendriti piramidnih neurona prekriveni su dendritičkim trnovima, a akson im je usmjeren prema bijeloj tvari i projicira se u druga područja kore velikoga mozga (kortiko-kortikalne projekcije) ili druge strukture središnjeg živčanog sustava (kortiko-subkortikalne projekcije). Još u moždanoj kori aksoni daju brojne pobočne ogranke (kolaterale). Mnogi piramidni neuroni pokazuju razlike u morfologiji ovisno o laminarnom rasporedu i veličini tijela pa se po nekim klasifikacijama oni mogu podijeliti u skupinu tipičnih i modificiranih piramidnih neurona (Braak i Braak, 1985). U skupini modificiranih piramidnih neurona spadaju piramide koje značajno odstupaju od pravilnog ustroja dendrita te se tu ubrajaju posebne vrste piramida sloja V koje su specifične za neka područja (Betzovi gigantski neuroni u primarnom motornom korteksu, Meynertovi piramidni neuroni u primarnom vidnom korteksu) i bipolarni neuroni sloja VI. No, sve ove neurone karakterizira akson koji napušta odgovarajuće područje kore. Dio piramidnih neurona tijekom razvoja u potpunosti transformira dendrite. Nakon što poprime oblik tipične piramide, dolazi do povlačenja apikalnog dendrita, a uz to se povlači i glavna grana aksona koji napušta korteks. Ovo se događa kod glutamatergičkih neurona koji izgrađuju sloj IV (Vercelli i sur., 1992, Nieuwenhuys, 1994, Markram i sur., 2004). Tako ovi neuroni imaju zvjezdasto razgranate dendrite prekrivene trnovima (eng. *spiny stellate cells*) te za razliku od tipičnih i svih ostalih modificiranih piramidnih neurona, ovi neuroni nisu projekcijski jer akson uspostavlja sinapse samo lokalno unutar dijela kore gdje su smješteni i ne odlazi u bijelu tvar.

Ovakvo obilježje imaju GABA-ergički inhibicijski neuroni, koji ovisno o kortikalnom polju, području i vrsti, čine 15-30% svih kortikalnih neurona. Smješteni su u svim slojevima moždane kore, a uz glavni neurotransmiter gama-amino-maslačnu kiselinu, sintetiziraju i

jedan ili više neuropeptida te kalcij vežućih proteina. Imaju kratke aksone koji se granaju i uspostavljaju sinapse u izravnoj okolini tijela neurona te se stoga definiraju kao neuroni lokalnih neuronskih krugova. No ipak, manji broj kortikalnih GABA-ergičkih neurona posjeduje aksone koji ulaze u bijelu tvar (Tomioka i Rockland, 2007, Melzer i sur., 2012) i projiciraju se na udaljene kortikalne ciljeve. Oni najvećim dijelom potječu iz ranih fetalnih funkcionalnih neokortikalnih krugova (Kostović i Rakic, 1990, Super i Uylings, 2001, Judaš i sur., 2013), ali postoje i masivne GABA-ergičke projekcije koje u oba smjera povezuju septum i hipokampus. Kortikalni GABA-ergički neuroni u strukturnom i funkcionalnom smislu ne predstavljaju neurone „umetnute“ u glavni neuralni krug (kao što je to slučaj u kralježničnoj moždini gdje su većina inhibicijskih, GABA-ergičkih i glicinskih, neurona u svojstvu interneurona), no ipak se kao sinonim za ove neurone uvriježio i naziv interneuroni. S obzirom na morfologiju, molekularni sastav, specifičnosti veza i funkcionalna svojstva, interneuroni su vrlo heterogena populacija (Freund i Buzsaki, 1996, DeFelipe i sur., 2002, Markram i sur., 2004). Iako malobrojni, različite morfološko-funkcionalne vrste interneurona pristupaju različitim područjima tijela i dendrita projekcijskih neurona i drugih interneurona te imaju glavnu ulogu u regulaciji aktivnosti neuralne mreže (Khazipov i sur., 2001). Osim toga, GABA-ergički neuroni su neuroni koji uspostavljaju prve funkcionalne krugove telencefalona, a kod primata tijekom ranog i srednjeg fetalnog razdoblja dolazi do usložnjavanja GABA-ergičke neuralne mreže: osim promjena u zastupljenosti pojedinih subpopulacija i pojave novih populacija, tijekom evolucije dolazi i do promjena u njihovom porijeklu, migraciji ali i laminarnoj zastupljenosti.

## 1.2 PRENATALNI RAZVOJ MOZGA U ČOVJEKA I MAJMUNA

Razvoj mozga u primata je dinamičan, složen i dugotrajan proces koji započinje prenatalno i ne prestaje rođenjem već se nastavlja i tijekom života. Kod čovjeka, prenatalno doba traje prosječno 38 tjedana nakon ovulacije ili oplodnje (PCW, engl. *postconceptional week*), odnosno 264 dana, a kod makaki majmuna ono iznosi približno 166 dana (E, engl. *embryonic day*) (Silk i sur., 1993). Prenatalni razvoj dijeli se na embrionalno i fetalno razdoblje.

Embrionalno razdoblje kod čovjeka obuhvaća prvih 8 tjedana nakon začeća (8PCW, a kod majmuna ono obuhvaća prvih 44 dana (E44) (Hendrickx i Sawyer, 1975, Gribnau i Geijsberts, 1981).

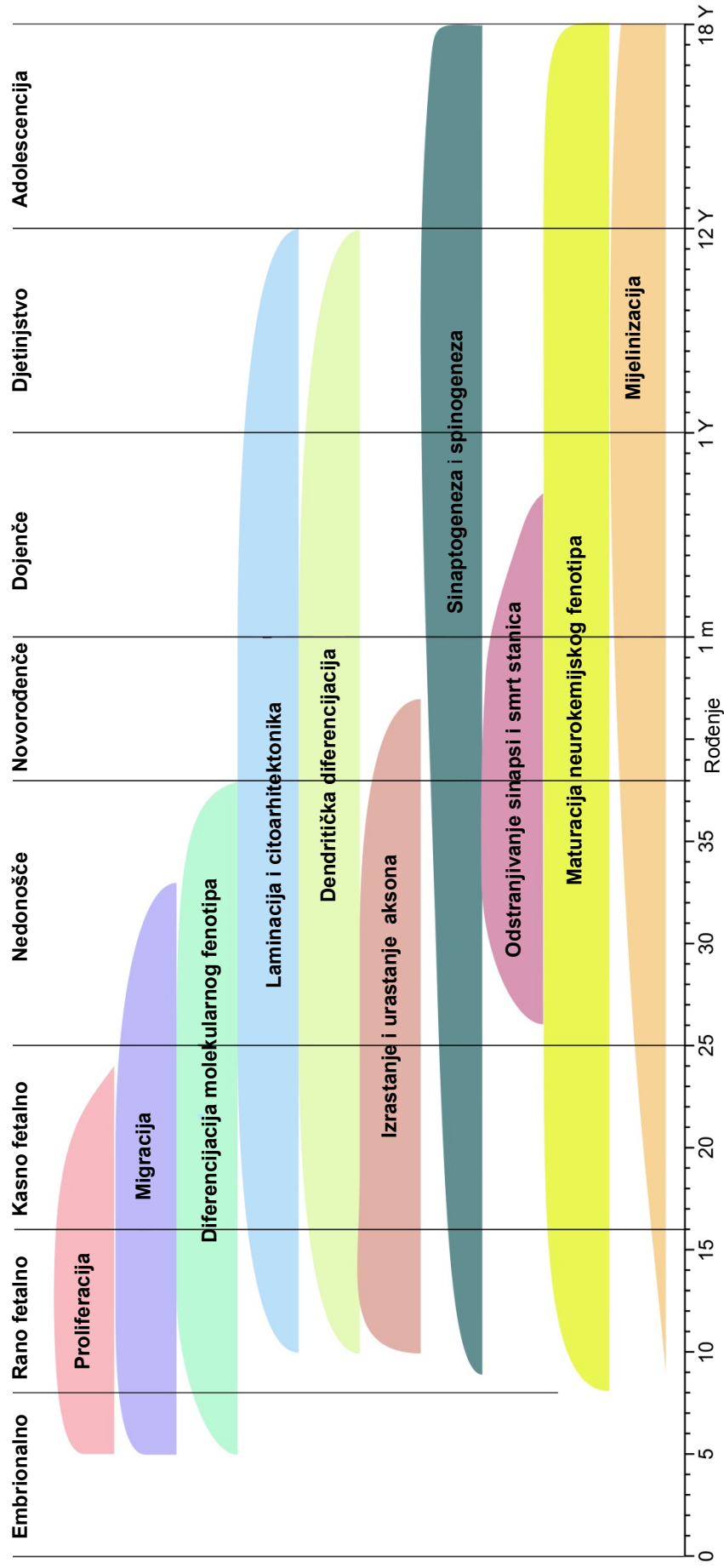
Na temelju vanjskih i unutarnjih morfoloških pokazatelja embrija, embrionalni razvoj dijeli se na 23 Carnegie stadija (CS). Podjelu embrionalnog razvitka u stadije utemeljio je Franklin P. Mall 1914. godine u Carnegie institutu, Washington, a modificirao ju je George Streeter, definirajući 23 stadija. Sadašnju verziju sustava razvili su O'Rahilly i Müller 1987. godine. Svaki stadij traje 2 ili 3 dana i definiran je pojavom određene strukture ili organa. Takav način stupnjevanja embrionalnog razvoja pouzdaniji je nego podjela na temelju gestacijske dobi ili duljine zametka (O'Rahilly i Müller, 1987), ali zbog nedostatka čvrsto utvrđenih morfoloških pokazatelja ovakav sustav stadija ne postoji za fetalno razdoblje, koje počinje krajem 8. tjedna nakon začeća i traje sve do rođenja (O'Rahilly i Müller, 2006).

Dok u ranijim razdobljima razvoja velikog mozga prevladavaju procesi proliferacije i migracije neurona, u kasnijim razdobljima prevladavaju procesi diferencijacije i sinaptogeneze (slika 1.1). No, jedno od karakterističnih obilježja razvoja velikog mozga čovjeka i majmuna jest dugo razdoblje kada se istovremeno velik broj neurona stvara, migrira ili započinje s diferencijacijom i sinaptogenezom (Rakic, 2009, Rakic i sur., 2009a, Kostović i Judaš, 2015). Razlike u intenzitetu, trajanju i posebnim obilježjima spomenutih histogenetskih procesa dovode do oblikovanja fetalnih zona čije složene citoarhitektonske transformacije omogućuju podjelu fetalnog razvoja moždane kore na zasebne faze i razdoblja. Tako se postembrionalno prenatalni razvoj u čovjeka može podijeliti na sljedeće stadije:

Stadij 1: razdoblje koje završava početkom drugog tromjesečja trudnoće i unutar kojega se razlikuje (1a) postembrionalno (CRL približno 30-50mm, 8-11PCW) i (1b) rano fetalno razdoblje (CRL približno 50-100mm, 12-14PCW);

Stadij 2: srednje tromjesečje trudnoće (CRL 100-250mm, 15-26PCW) unutar kojega se razlikuje (2a) srednje fetalno (15-22PCW) i (2b) kasno fetalno razdoblje (23-26PCW) te

Stadij 3: treće tromjesečje trudnoće i novorođenče (CRL približno 250-335mm, 27-44PCW), koje se dijeli na razdoblje (3a) ranog nedonoščeta (27-30PCW), (3b) kasnog nedonoščeta



**Slika 1.1** Razvojna razdoblja trajanja i intenziteta histogenetskih procesa u ljudskom mozgu.

Dok u ranijim razdobljima razvoja velikog mozga prevladavaju procesi proliferacije i migracije neurona, u kasnijim razdobljima prevladavaju procesi diferencijacije i sinaptogeneze. No, jedno od karakterističnih obilježja razvoja velikog mozga čovjeka i majmuna jest dugo razdoblje kada se istovremeno velik broj neurona stvara, migrira ili započinje s diferencijacijom i sinaptogenezom. Modificirano prema Kostović i Judaš, 2015.



(31-34PCW) i (3c) perinatalno razdoblje gdje je obuhvaćen i prvi mjesec nakon rođenja (35-44PCW).

Ovakva podjela fetalnog razvoja primijenjena je kod prikaza rezultata ovoga rada, a temelji se prvenstveno na podjeli predloženoj od strane Kostovića i suradnika (Kostović, 1990, Kostović, 1990, Kostović i Judaš, 1994, 1995, Judaš i Kostović, 1997, Kostović i sur., 2008, Kostović i Judaš, 2009), kao i klasifikaciji predloženoj od O'Rahilly i Müller (2006) čija se klasifikacija na Carnegie stadije koristila za definiranje embrionalnog razdoblja. Kako klasifikacija stadija u makaki majmuna nije tako dobro definirana kao u čovjeka, prema raspoloživom materijalu napravljena je sljedeća klasifikacija koja odgovara ljudskim stadijima:

Stadij 1: unutar kojega se razlikuje (1a) rano postembrionalno razdoblje (E44-E50) i (1b) rano fetalno (E50-E60);

Stadij 2: unutar kojega se razlikuje (2a) srednje fetalno razdoblje (E60-E70) i (2b) kasno fetalno razdoblje (E70-E90) te

Stadij 3: obuhvaća razdoblje od E90 do rođenja.

Kod klasifikacije do izražaja posebno dolazi problem definiranja i upotrebe termina kasnog fetalnog razdoblja, s obzirom na to da se za prenatalnu klasifikaciju kod majmuna ne upotrebljava termin nedonoščeta (prematurusa). Zato se kod majmuna za cjelokupan stadij 2 u literaturi koristi termin srednje fetalno razdoblje, a stadij 3 se definira kao kasno fetalno razdoblje. Korištenje ovakve terminologije za ove stadije je suštinski ispravno, ali kod čovjeka bi otežalo definiciju podstadija. Kako u ovoj studiji nije analiziran materijal stadija 3, zbog korištenja zajedničke terminologije za odgovarajuće podstadije i kod čovjeka i kod majmuna, stadij 2a definiran je kao prijelaz ranog u srednje fetalno razdoblje, a stadij 2b kao srednje fetalno razdoblje.

### 1.2.1 MORFOGENEZA

Razvojnu osnovu cijelog središnjeg živčanog sustava čini neuralna cijev čija je stijenka izgrađena od nediferenciranih stupićastih neuroepitelnih stanica. Njihovim se umnažanjem (proliferacijom) razvijaju svi neuroni i makroglija (astrociti i oligodendrociti) središnjeg živčanog sustava.

#### 1.2.1.1 Razvoj mozga prema Carnegie stadijima

Osnova živčanog sustava nastaje prije osnove drugih organa (O'Rahilly i Muller, 1981, O'Rahilly i Müller, 2006). Oko 23. dana nakon začeća (CS8) može se uočiti prva vidljiva naznaka razvoja živčanog sustava, neuralna ploča. U tom je stadiju rostralni dio embrija (buduća osnova velikog mozga) širi od kaudalnog. Oko 26. dana nakon začeća (CS9) medijalni dijelovi ploče počinju zadebljavati i uzdizati se te nastaju neuralni nabori koji ograničavaju neuralni žlijeb. Neuralni se nabori počinju spajati oko 29. dana nakon začeća (CS10) u području rombencefalona i spinalne moždine te oblikuju neuralnu cijev. Rostralni otvor (*neuroporus rostralis*) neuralne cijevi zatvori se oko 30. dana nakon začeća (CS11), a oko 31. dana se zatvori i kaudalni otvor. Proces nastajanja neuralne cijevi naziva se primarna neurulacija.

Rano tijekom embrionalnog razvoja mogu se uočiti razvojne osnove različitih moždanih struktura (O'Rahilly i Müller, 1987, 2006, Judaš, 2011). Prije nastanka neuralne cijevi, na prijelazu iz Carnegie stadija 8 u stadij 9, rostralno se mogu prepoznati tri glavna dijela budućeg velikog mozga: *prosencephalon* (većinom diencefalona), *mesencephalon* i *rhombencephalon* te ušna pločica (*discus oticus*) kao osnova budućeg unutarnjeg uha. U idućem se stadiju u razvojnoj osnovi diencefalona mogu uočiti osnova budućeg talamusa i vidna pločica (*discus opticus*) kao osnova mrežnice, hijazmatska ploča kao osnova budućeg križanja vidnog živca. U ovom se stadiju uočavaju i prvi tragovi telencefalona kao lateralni dijelovi prozencefalona ispred hijazmatske ploče. U Carnegie stadiju 11 uočavaju se razvojne osnove završne ploče (*lamina terminalis*) i komisurne ploče u dnu neparnog dijela telencefalona (*telencephalon impar*), razvojna osnova mamilarnih tjelešca kao i razvojne osnove adenohipofize i neurohipofize.

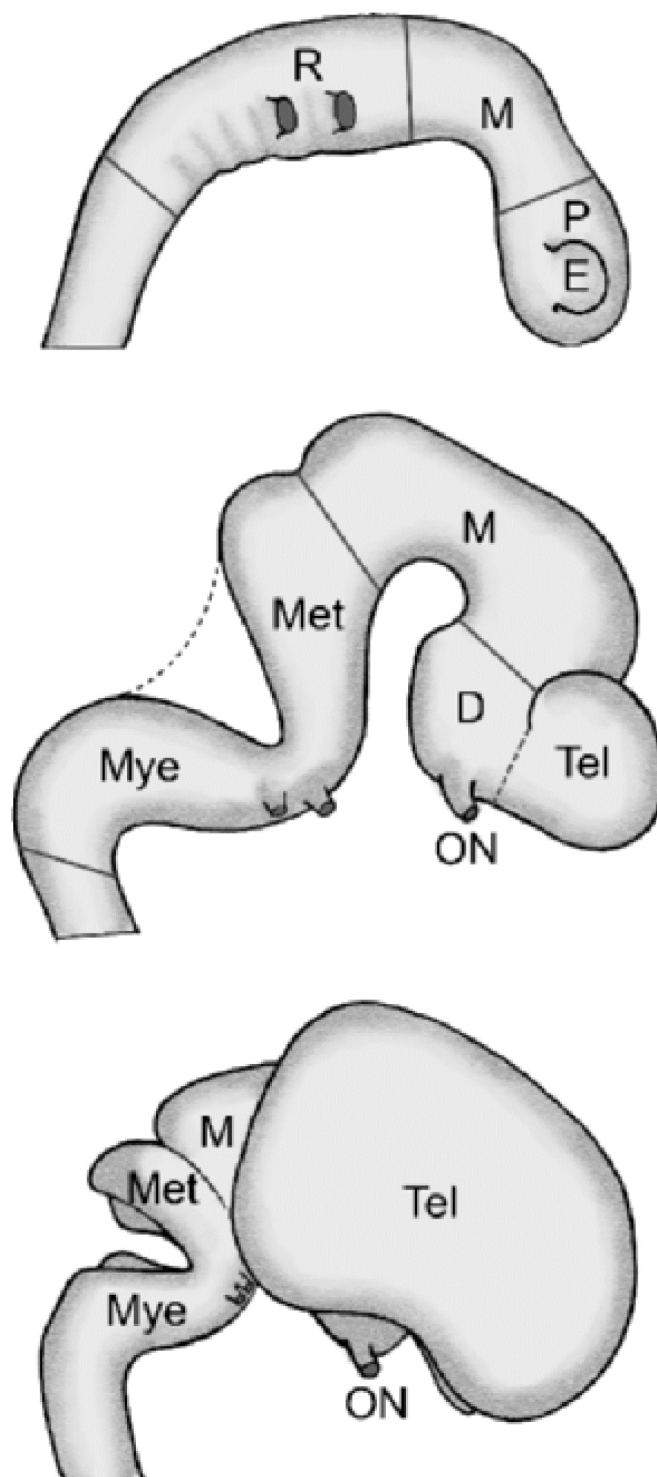
Prvi stadij u kojemu je živčani sustav potpuno zatvoren i odijeljen od ostatka organizma je Carnegie stadij 13 (oko 32. dana nakon začeća). U ovom stadiju još nema karakterističnog proširenja kranijalnog dijela neuralne cijevi. Uočavaju se razvojne osnove moždanih polutki u stijenci središnjeg, neparnog dijela telencefalona (*telencephalon impar*), a u razvojnoj osnovi diencefalona mogu se uočiti mamilarno i infundibularno područje. Pojavljuje se i razvojna osnova malog mozga kao zadebljanje alarne ploče rombencefalona.

U Carnegie stadiju 14 (oko 33. dana nakon začeća) razvojna osnova telencefaličkih mjehurića odvojena je od osnove diencefalona diencefalo-telencefaličkim žlijebom. Pojavljuje se i medijalni ganglijski brežuljak koji potječe od razvojne osnove diencefalona. U idućem se stadiju pojavljuje drugi dio razvojne osnove bazalnih ganglija, lateralni ganglijski brežuljak, koji potječe od razvojne osnove telencefalona. Klasična podjela razvojne osnove velikog mozga na pet moždanih mjehurića (*telencephalon*, *diencephalon*, *mesencephalon*, *myelencephalon* i *metencephalon*) u potpunosti je vidljiva u Carnegie stadiju 15 (5PCW). Diencefalonski se u ovom stadiju može podijeliti u pet longitudinalnih zona: epitalamus, dorzalni talamus, ventralni talamus, subtalamus i hipotalamus. Uočava se i hipotalamički žlijeb koji odvađa ventralni talamus od hipotalamusa. Također se vide i habenularne i mamilarne jezgre. Glavne tipove moždane kore, *archicortex* (hipokampus), *paleocortex* (njušno područje) i *neocortex*, moguće je prepoznati u Carnegie stadiju 16 (5,5PCW). U ovom stadiju, zbog rasta moždanih polutki prema rostralno i dorzalno, telencefalonski postupno prekriva diencefalonski. Pojavljuju se i *fissura longitudinalis* te *commisura posterior*. U Carnegie stadiju 17 (6PCW) u području žlijeba, *fissura longitudinalis*, razvijaju se krvne žile budućeg koroidnog spleta. Uočavaju se *bulbus olfactorius* i *tuberculum olfactorium* te se pojavljuju važne jezgre u velikom mozgu (amigdala, septalne jezgre), mezencefalonu (*nucleus niger*, *nucleus ruber* i *nucleus interpeduncularis*) te *locus coeruleus* u rombencefalonu. Držak hemisfere povezuje moždane polutke s ventralnim talamusom i medijalnim ganglijskim brežuljkom. Pojavom stražnje komisure u ovom stadiju može se odrediti jasna granica između diencefalona i mezencefalona, koja prolazi kroz stražnju komisuru i komisuru gornjih kolikula. Rast moždanih polutki nastavlja se u Carnegie stadiju 18 kada *fissura longitudinalis cerebri* dopire do polovice moždanih polutki, vidi se i lateralni ganglijski brežuljak, odnosno budući *corpus striatum*, a po prvi se puta uočava razvojna osnova *nucleus dentatus* u malom mozgu. U ovom stadiju se koroidni splet nalazi u četvrtoj i u postraničnim moždanim komorama. Na prijelazu iz Carnegie stadija 18 u stadij 19 (6,5PCW) pojavljuje se razvojna osnova *globus pallidus externus*. U Carnegie stadiju 19 uočava se *nucleus accumbens septi*, a u stadiju 20 (7PCW) počinju se razvijati medijalna septalna jezgra i dijagonalna jezgra. Također, stanice koroidnog spleta postraničnih komora imaju kuboidni oblik u Carnegie stadiju 20. U Carnegie stadiju 21 po prvi puta se pojavljuje kortikalna ploča u stijenci telencefalona, i to u neposrednoj blizini lateralnog ganglijskog brežuljka. U ovom stadiju prijelaz hemisfere prema diencefalonu čini držak hemisfere (*Hemisphärenstiel* of *Hochstetter*) koji sadrži debeli snop vlakana, *fasciculus lateralis prosencephalicus* (*Stammbündel* of *His*). Također se razaznaju važni dijelovi subtalamičkog područja: *nucleus subthalamicus proper*, *nucleus entopeduncularis* (budući *globus pallidus internus*) i *globus pallidus externus*. U Carnegie stadiju 22 (7,5PCW) pojavljuje se unutanja čahura, *capsula interna*, i u ovom razdoblju povezuje neokorteks s tri područja: epitalamusom, dorzalnim

talamusom i mesencefalonom. Također se počinje razvijati posljednji klasični bazalni ganglij, *claustrum*, a uz njega nastaje i vanjska čuhura, *capsula externa*. U ovom se razdoblju kortikalna ploča proteže preko polovice površine neopalijuma, vidljiv je donji rog postranične klijetke, a terminalni žlijeb čini unutarnju granicu telencefalona i diencefalona. U posljednjem stadiju embrionalnog razdoblja, Carnegie stadiju 23 (8PCW), kroz skoro cijeli neokorteks proteže se kortikalna ploča. Hipokampus je smješten u temporalnom polu, a inzula se nazire kao udubljeno područje. Koroidni splet u ovom stadiju postaje lobularan. Razvojne osnove kaudatusa i putamena uočavaju se u strijatumu, a *globus pallidus externus* se premjestio iz diencefaličkog u telencefalički dio hemisfere. U ovom stadiju počinje se razvijati *commisura anterior*, a gornji i donji krakovi malog mozga dobro se razaznaju. Na granici rombencefalona i spinalne moždine uočava se križanje piramida, *decussatio pyramidum*.

### 1.2.1.2 Razvoj i podjela fetalnog telencefalona

Embrionalni razvoj ljudskog telencefalona obilježen je brzim i složenim promjenama u morfologiji tkiva i ekspresiji gena. Ubrzo nakon zatvaranja kranijalnog i kaudalnog kraja neuralne cijevi, nejednako odvijanje složenih histogenetskih procesa uzrokuju rast neuralne cijevi, promjene njezinog oblika i promjene građe njezine stijenke. Dio neuralne cijevi koji će dati osnovu za mozak pokazuje proširenja u obliku već ranije spomenutih triju primarnih mjehurića koji se od kaudalno prema rostralno nadovezuju na kralježničnu moždinu: mjehurić stražnjeg mozga (*rhombencephalon*), mjehurić srednjeg mozga (*mesencephalon*) i mjehurić prednjeg mozga (*prosencephalon*). U daljnjem razvitku povećava se broj moždanih mjehurića te se mijenja i njihov smještaj (slika 1.2). Najviše raste mjehurić prednjeg mozga: na rostralnom dijelu izbočuje se obostrano prema lateralno i tako nastaje parni mjehurić krajnjeg mozga (*telencephalon*), dok stražnji dio ostaje relativno malen i oblikuje mjehurić međumozga (*diencephalon*). Od parnih telencefaličkih mjehurića razvijaju se moždane polutke (hemisfere), čiju površinu prekriva tanka moždana kora (*cortex cerebri*), a unutrašnjost čine bijela tvar velikog mozga (*substantia alba cerebri*), bazalni gangliji telencefalona (*nucleus caudatus*, *putamen*, *claustrum* i *corpus amygdaloideum*) i lateralne moždane komore. Od središnjeg, neparnog dijela (*telencephalon impar*) što spaja lijevi i desni telencefalički mjehurić, razvijaju se strukture mediobazalnog telencefalona i *lamina terminalis*, a u tom se području razvijaju i tri komisurna sustava telencefalona. Tri privremena uzdužna žlijeba podijele diencefalon u četiri uzdužne zone od kojih se razvijaju *epithalamus*, *thalamus*, *hypothalamus* i *subthalamus*, dok od šupljine diencefaličkog mjehurića nastaje III. moždana komora. Također i *globus pallidus*, koji je u odraslom mozgu naizgled dio bazalnih ganglija, razvije se od diencefaličkog mjehurića (Judaš i Kostović, 1997). Za razliku od ovog klasičnog objašnjenja, podaci iz nedavnih molekularno genetičkih istraživanja podupiru “neuromeričku”



**Slika 1.2 Primarni i sekundarni moždani mjehurići temelj su regionalne podjele odraslog mozga.**

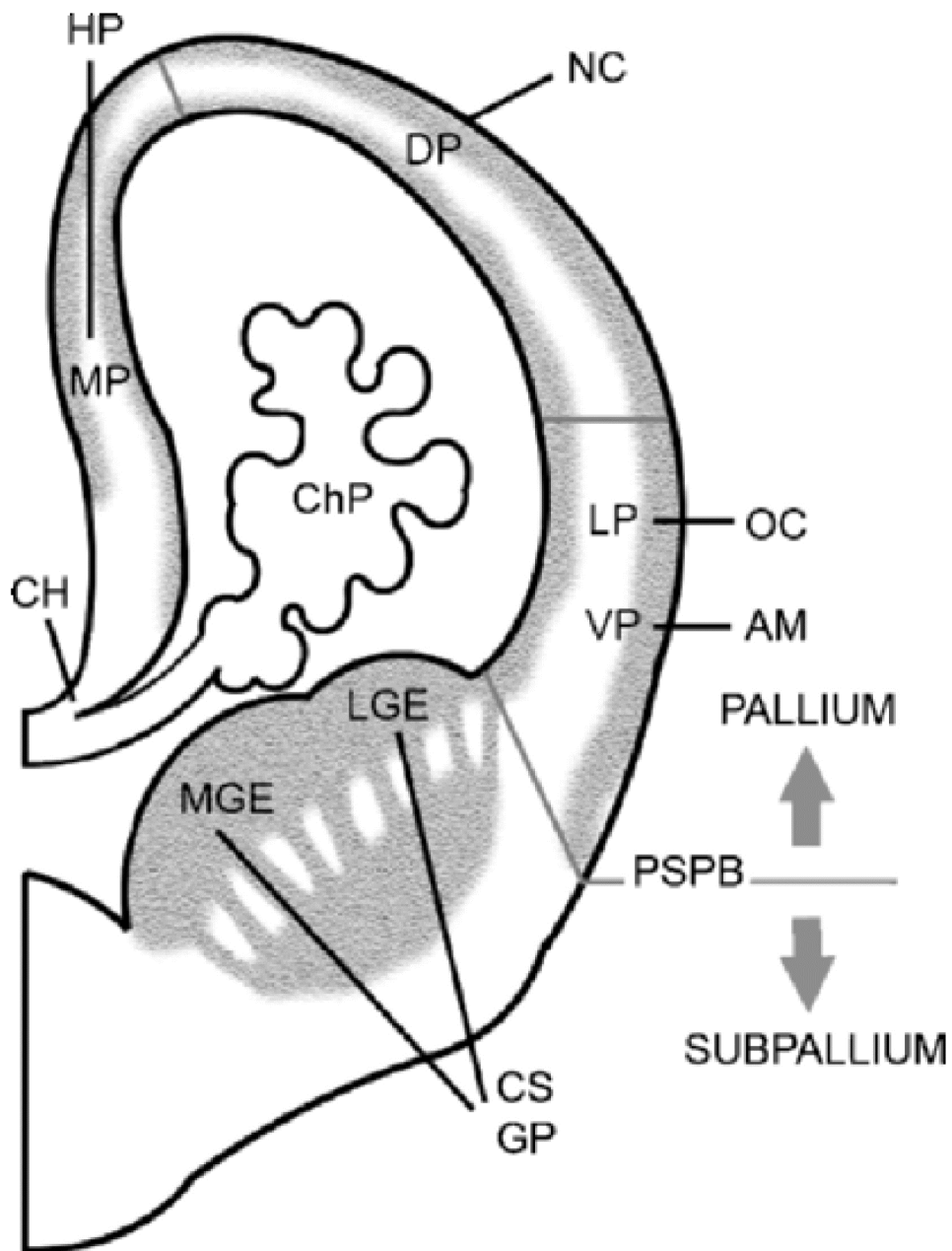
Tri uzastopna proširenja prednjeg kraja neuralne cijevi oblikuju primarne moždane mjehuriće: rhombencephalon (R) koji se podijeli na metencephalon (Met) i myelencephalon (Mye), mesencephalon (M) i prosencephalon (P) koji se podijeli na telencephalon (Tel) i diencephalon (D). E, oko; ON, vidni živac. Preuzeto iz Aboitiz i Montiel 2007.

teoriju koja predlaže drukčiju organizaciju prednjeg mozga (engl. *forebrain*). Prema toj teoriji, primarni mjehurić prednjeg mozga podijeli se na kaudalni diencefalon i rostralni sekundarni mjehurić prednjeg mozga. Sekundarni mjehurić prednjeg mozga (*prosencephalon*) obuhvaća cijeli prehordalni (najrostralniji) dio neuralne cijevi, a od njega se razvijaju hipotalamus ventralno, očni mjehurići dorzolateralno, telencefalički mjehurići dorzalno te ventralno telencefaličko preoptičko područje (Puelles i Rubenstein, 1993, 2003, Vieira i sur., 2010, Moreno i Gonzalez, 2011, Puelles i sur., 2013).

Moždane polutke se, prema klasičnom shvaćanju, dijele na dorzalno smješteni palijum i na ventralno smješteni subpalijum koji su odvojeni kortiko-strijatalnim žlijebom, odnosno palijalno-subpalijalnom granicom (slika 1.3). Subpalijum je obilježen ekspresijom *Dlx* gena, dok su u palijumu eksprimirani *Pax-6* i *Tbr-1*, uz ostale biljege. I palijum i subpalijum će se podijeliti u manja područja iz kojih će se razviti razne jezgre ili kortikalna područja i slojevi koja zadržavaju svoja prvobitna molekularna obilježja (Liu i sur., 1997, Eisenstat i sur., 1999, Puelles, 2001).

Subpalijum se nalazi na bazi telencefaličkog mjehurića i sastoji se od malog medijalnog, odnosno septalnog područja te puno većeg lateralnog područja. Pred kraj embrionalnog razdoblja u bazolateralnom dijelu telencefaličkog mjehurića subventrikularna zona zadeblja i tvori intraventrikularno izbočenje na obje strane. Ventrikularni žlijeb podijeli rostralni dio izduljenog izbočenja u medijalni i lateralni ganglijski brežuljak, dok kaudalni dio ostaje nepodijeljen. Ganglijski brežuljak je tipična fetalna struktura koja kasnije posve nestane, no tijekom prenatalnog razvoja ovo je područje ključno za patogenezu periventrikularnog krvarenja u prijevremeno rođene djece. Od lateralnog dijela brežuljka razvijaju se neuroni kaudatusa, putamena, klaustruma, amigdala i bazalne Meynertove jezgre, a od medijalnog neuroni jezgre, *nucleus accumbens septi*. Već je spomenuto da se globus palidus razvija od diencefalona. Neuroni kompleksa amigdaloidnih jezgara većinom dolaze iz kaudalog dijela ganglijskog brežuljka

Palijum se nalazi na vrhu telencefaličkog mjehurića i poput plašta prekriva međumozak i moždano stablo. Može se podijeliti na medijalni dio (od kojeg nastaje hipokampus), dorzalni dio (od kojeg nastaje neokorteks ili izokorteks) i lateralni dio (od kojeg nastaje olfaktorni korteks) sprijeda povezan s olfaktornim bulbusom. Iako su odraslom mozgu sve ove strukture slojevito građene, neokorteks izgrađuje šest slojeva, dok su olfaktorni ili lateralni (paleokorteks) te hipokampus ili medijalni korteks (arhikorteks) izgrađeni od dva ili tri sloja. Nedavna istraživanja su pokazala da se na granici između palijuma i subpalijuma može razaznati dodatni embrionalni dio, ventralni palijum. U tom se području razvija nekoliko struktura koje imaju i palijalne i subpalijalne elemente (dijelovi klaustroamigdalarnog kompleksa: klastrum, endopiriformne jezgre lateralni i bazalni dijelovi amigdala). U najmedijalnijem dijelu palijuma, između hipokampalne osnove i koroidnog



**Slika 1.3 Podjela fetalnog telencefalona.**

Moždane polutke se sastoje od ventralnog dijela ili subpalijuma koji je odvojen od palijuma palio-subpalijalnom granicom (PSPB). Medijalni ganglijski brežuljak (MGE) i lateralni ganglijski brežuljak (LGE) daju osnovu za globus pallidus (GP) i corpus striatum (CS). Također stvaraju interneurone za palijalne regije. Palijum se sastoji od medijalnog palijuma (MP) iz kojeg nastaje hipokampus (HP), dorzalnog palijuma (DP) iz kojeg se razvija neokorteks (NC), lateralnog palijuma (LP) iz kojeg nastaje olfaktorni korteks (OC) i ventralnog palijuma (VP) iz kojeg se razvija dio klaustroamigdalarnе cjeline (AM). U najmedijalnijem dijelu palijuma smještena je embrionalna struktura, kortikal hem (CH), koja odvaja medijalni palijum od koroidnog spleta. Preuzeto iz Aboitiz i Montiel 2007.

spleta (koji se razvija od krovne ploče), nalazi se embrionalna struktura koja ima ulogu hipokampalnog organizatora, kortikalni hem (CH, engl. *cortical hem*) (Grove i sur., 1998, Aboitiz i Montiel, 2007, Subramanian i sur., 2009)

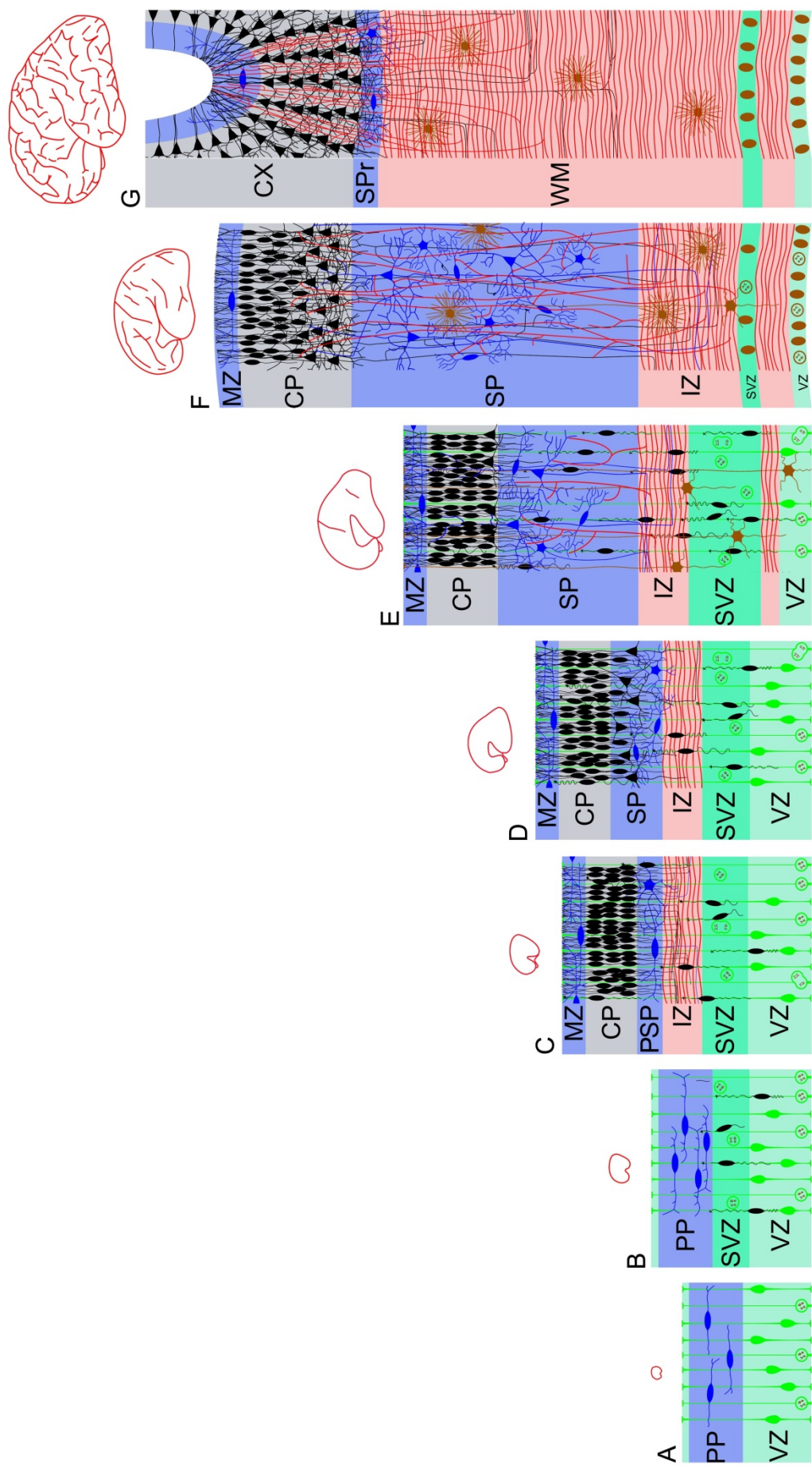
Na temelju ekspresije LHX2, transkripcijskog faktora LIM homeodomene koji je prisutan u kortikalnom primordiju i ključan je u specifikiranju kortikalnih stanica, dorzalni telencefalon se dijeli u dva područja: kortikalno područje od kojeg se razvijaju neokorteks i hipokampus te drugi, središnji dio (dorzalna središnja linija) od kojeg se razvijaju kortikalni hem i koroidni splet (Monuki i sur., 2001, Hebert i Fishell, 2008, Mangale i sur., 2008). Kortikalni hem, kao i dijelovi koroidnog spleta dokazani su kao izvor Cajal-Retziusovih stanica u miša (Cabrera-Socorro i sur., 2007), a isto je sugerirano i kod čovjeka (Meyer, 2010). No, kako je u miša ovo područje izrazito diskretno, razumijevanje uloge ovih područja u stvaranju kortikalnih neurona nije detaljno razjašnjeno.



### 1.2.2 HISTOGENEZA

Razvoj ljudskog telencefalona temelji se na slijedu složenih progresivnih i reorganizacijskih histogenetskih procesa kao što su umnažanje (proliferacija) stanica preteča neurona i glije, putovanje (migracija) neurona od mjesta posljednje mitoze do njihovog ciljnog područja, izrastanje aksona i dendrita, dozrijevanje biokemijsko-metaboličkih sustava karakterističnih za specifičnu vrstu stanice (diferencijacija molekularnog fenotipa stanice), razvoj sinapsi (sinaptogeneza), normalna razvojna smrt stanica (apoptoza), povlačenje (retrakciji) i premještanje aksona ili aksonskih ogranaka, smanjivanje broja prekobrojnih sinapsi i dendritičkih trnova (spina), nestanak privremenih i smanjivanje broja prekobrojnih sinapsi i promjene neurotransmiterskog fenotipa neurona. Razlike u intenzitetu, trajanju i posebnim obilježjima ovih histogenetskih procesa dovode do oblikovanja posebnih slojeva stijenke embrionalnog i fetalnog mozga. Ti se slojevi nazivaju embrionalne ili fetalne zone. Sedamdesetih godina prošloga stoljeća na temelju elektronskomikroskopske i 3H-TdR autoradiografske analize te mikroskopske analize Golgi metodom impregniranih rezova ljudskog i mišjeg embrionalnog mozga, predstavljen je dijagram dinamičkih staničnih događaja u cerebralnom zidu (Rakic, 1971, 2006). Opisani su posebni slojevi stijenke embrionalnog i fetalnog mozga, slojevi koji su prostorni pokazatelji histogenetskih procesa: ventrikularna zona (VZ), subventrikularna zona (SVZ), intermedijalna zona (IZ), kortikalna ploča (CP), marginalna zona (MZ). Sredinom sedamdesetih godina opisan je još jedan sloj, sloj pod pločom (SP) (Kostović i Molliver, 1974, Bystron i sur., 2008, Judaš i sur., 2013). Tipična laminacija stijenke fetalnog telencefalona (slika 1.4) najbolje se uočava u razdoblju od 15. do 24. tjedna nakon začeća te se poredane od fetalnih moždanih komora (ranije u razvoju, od šupljine neuralne cijevi) prema pijalnoj površini mogu uočiti:

- 1.) ventrikularna zona koja nastaje u 3. tjednu nakon začeća, a u njoj se proliferacijom, odnosno simetričnim i asimetričnim diobama, umnažaju preteče neurona i glije;
- 2.) subventrikularna zona koja nastaje u 7. tjednu nakon začeća i kod čovjeka postaje glavni izvor kortikalnih neurona;
- 3.) intermedijalna zona kroz koju radijalno i tangencijalno migriraju kortikalni neuroni te urastaju aferentni i eferentni aksoni na putu prema svom konačnom odredištu;
- 4.) subplate zona počinje se oblikovati oko 13., a oko 15. tjedna potpuno je razvijena i u tom obliku postoji do otprilike 35. tjedna nakon začeća. Predstavlja zonu u kojoj se odvija najviše histogenetskih procesa (urastanje talamokortikalnih i kortikokortikalnih aksona, pojava prvih sinapsi, ekspresija brojnih molekula za vođenje aksona) ključnih za normalan razvoj moždane kore. Privremeni oblici organizacije kortikalnih neuronskih krugova u ovoj zoni tijekom kasnog fetalnog razdoblja predstavljaju neurobiološku podlogu privremenih oblika funkcionalne aktivnosti i obrazaca ponašanja u nedonoščadi;



**Slika 1.4 Dijagram dinamičkih histogenetskih procesa tijekom razvoja telencefalona.**

Oblikovanje posebnih slojeva neokortikalne stijenke od embrionalnog (a) do kasnog fetalnog razdoblja (g). Proliferativne zone (ventrikularna zona, VZ i subventrikularna zona, SVZ) su prikazane zelenom bojom; rani sinaptički i postmitotički slojevi s postmigratornim neuronima (preplate, PP; subplate, SP; marginalna zona, MZ) plavom bojom; sloj postmigratornih neurona (kortikalna ploča, CP) sivom bojom; fetalna bijela tvar crvenom bojom; progenitori zelenom, rano diferencirani neuroni MZ i SP plavom, neuroni CP i migratorni neuroni crnom te glija stanice smeđom bojom. Preuzeto iz Kostović i Judaš, 2015.

5.) kortikalna ploča koja nastaje nakon 7. tjedna nakon začeća pristizanjem migrirajućih postmitotičkih neurona iz proliferativnih zona. Projekcijski glutamatergički neuroni stvaraju se u dorzalnim proliferativnim zonama te radijalnom migracijom putuju do svog konačnog položaja, dok se kortikalni GABA-ergički interneuroni stvaraju i u dorzalnim proliferativnim zonama te u ganglijskom brežuljku odakle tangencijalno migriraju do svog odredišta u kortikalnoj ploči;

6.) marginalna zona koja je smještena ispod pijalne površine (isprva iznad ventrikularne zone, a potom iznad kortikalne ploče), a u razdoblju od 18. do 28. tjedna nakon začeća pokazuje složenu šesteroslojnu staničnu organizaciju.

Tri površnije zone (subplate zona, kortikalna ploča i marginalna zona) čine razvojnu osnovu moždane kore. Marginalna zona se tijekom razvoja pretvori u sloj I moždane kore, dok se kortikalna ploča pretvara u slojeve II-VI. Iako subplate zona nestaje kao citoarhitektonski odjeljak, subplate neuroni ne nestaju sa subplate zonom, nego se uključe u subkortikalnu bijelu tvar kao intersticijski neuroni bijele tvari (Kostović i Rakic, 1980, 1990). Iz fetalne intermedijalne zone razvije se bijela tvar odraslih moždanih polutki, a od proliferacijskih zona u odraslom mozgu preostane tek tanki sloj ependimskih stanica u stijenci moždanih komora (Judaš i Kostović, 1997). Posebno je važno naglasiti da kroz filogenezu subplate zona, ali i marginalna zona postaju sve složenije strukture te bi u ranom fetalnom razdoblju subplate zonu bilo točnije definirati kao primordijalni subplate (presubplate), a marginalnu zonu kao primordijalnu marginalnu zonu (Kostović i sur., 2013).

### 1.2.2.1 Slojevi stijenke telencefalona prije stvaranja kortikalne ploče

#### 1.2.2.1.1 Proliferativne zone

Nediferencirane stupačaste neuroepitelne stanice koje izgrađuju stijenku neuralne cijevi čine sloj nazvan ventrikularna zona. Neuroepitelne stanice raspoređene su u jednom sloju, ali tako da su njihove jezgre položene u više redova (pseudostratificirani stupačasti epitel), a njihovi radijalni izdanci sežu do pijalne površine. U ranijim stadijima, prije početka neurogeneze, te se stanice dijele simetričnim diobama (svaka stanica preteča se podijeli na dvije nove stanice preteče). Pri tome se njihova jezgra nedugo prije metafaze i citokineze pomiče kroz apikalni nastavak prema ventrikularnoj površini, a tijekom sinteze DNA migrira prema pijačnoj površini. To gibanje naziva se interkinetična nuklearna migracija (Sauer, 1935, Caviness i Rakic, 1978). Početak neurogeneze označen je pojavom asimetričnih diobi u ventrikularnoj zoni, oko 33. dana nakon začeća u lateralnom kortikalnom zidu kod čovjeka, a oko E10 kod miša (Rakic, 1988, 1995, Bystron i sur., 2006). Asimetričnom diobom nastaje jedna stanica preteča koja se dalje dijeli i jedna postmitotička stanica koja će postati neuron ili glija stanica. Duljina prve faze proliferacije (simetrična dioba), tijekom koje se povećava debljina, ali i površina ventrikularne zone, odredit će konačni ukupan broj kortikalnih neurona, radijalnih jedinica (te kasnije ontogenetskih ili embrionalnih kolumni), a samim time i predispoziciju za konačnu veličinu površine kore mozga (Caviness i sur., 2003). Duljina druge faze proliferacije (asimetrična dioba), tijekom koje se uglavnom povećava debljina ventrikularne zone, odredit će predispoziciju za konačnu debljinu kore mozga (Rakic, 1995). Promjena u regulaciji mehanizma umnažanja preteča neurona je ključ povećanja broja neurona do kojeg dolazi tijekom evolucije. Povećanjem broja mitotičkih ciklusa simetričnih dioba u preteča eksponencijalno se povećava i njihov broj. Naime, povećanje broja neurona između miša i čovjeka (1000x) može se postići uz 10 dodatnih ciklusa simetričnih dioba preteča neurona. Razdoblje proliferacije neurona u čovjeka traje oko 100 dana (E42-E140, u više od 30 ciklusa), a kod majmuna oko 60 dana (E40-E100, 28 ciklusa), što je znatno duže nego u miša kod kojeg neurogeneza traje od E11-E17 (11 ciklusa). No i mitotički ciklus stvaranja neurona nekoliko puta je duži u čovjeka, pa jedna preteča neurona u čovjeka proizvede svega 3-5x više neurona nego u miša (Kostović i sur., 2013).

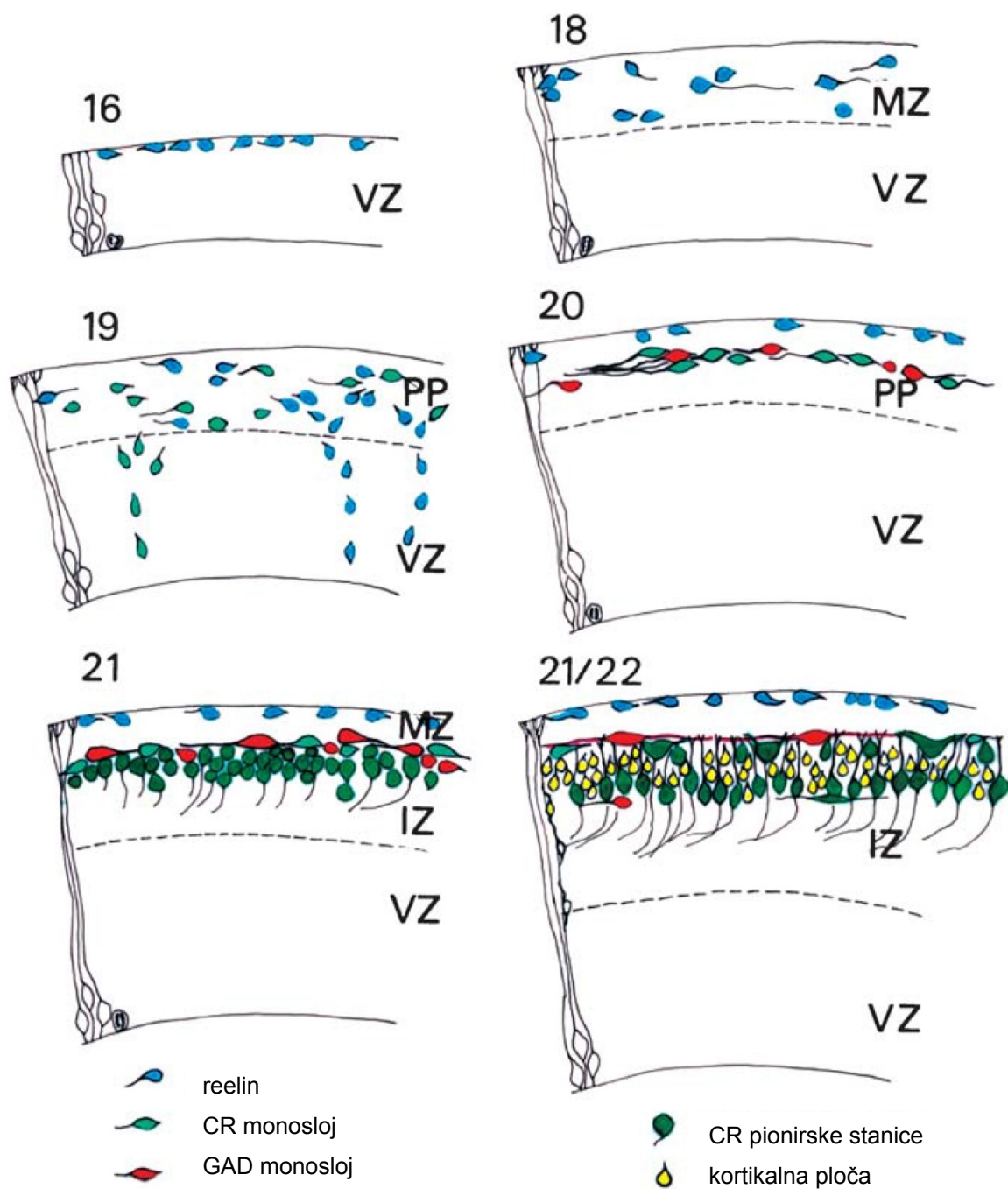
U ventrikularnoj zoni postoji više vrsta stanica preteča neurona i glije čija su morfološka i molekularna obilježja trenutno predmet intenzivnih istraživanja, no posebno istaknutu i prepoznatljivu skupinu čine radijalne glija stanice. Osim što služe kao vodiči nezrelim, postmitotičkim neuronima koji radijalno migriraju, novija istraživanja su pokazala da radijalne glija stanice u nekoliko ciklusa asimetrične diobe stvaraju i nezrele neurone koji poprimaju bipolarni izgled i zatim u interakciji s radijalnom glijom putuju prema pijačnoj

površini (Weissman i sur., 2003, Rakic, 2006, Mo i sur., 2007, Hansen i sur., 2010). Nakon što završi neurogeneza, radijalna glija retrahira svoje nastavke i postaje astrocit, s mogućnošću da tijekom tog procesa nastavi proliferaciju stvarajući prekursore astrocita, ili same astrocite.

Između 7. i 8. tjedna nakon začeća na bazalnoj granici ventrikularne zone počinju se nakupljati mitotički aktivne stanice (intermedijalne preteče) stvarajući novi sloj iznad ventrikularne zone, nazvan subventrikularna zona. Ove stanice nisu u kontaktu sa ventrikularnom površinom i njihove jezgre ne ulaze u proces interkinetičke nuklearne migraciji (Takahashi i sur., 1995). Intermedijalne preteče nastaju asimetričnom diobom radijalnih glijalnih stanica u ventrikularnoj zoni te se zatim premještaju (migriraju) u subventrikularnu zonu, gdje se podijele na dva postmitotička neurona buduće moždane kore (Haubensak i sur., 2004, Miyata, 2004, Noctor i sur., 2004, Bystron i sur., 2008). Tijekom evolucije dolazi do povećanja i usložnjavanja subventrikularne zone te je njena stanična organizacija u primata znatno različita od one u drugih vrsta (Smart i sur., 2002, Zecevic i sur., 2005, Dehay i Kennedy, 2007).

#### **1.2.2.1.2 Rana neokortikalna osnova: preteča kortikalne ploče (preplate)**

U posljednja dva desetljeća, studije na različitim vrstama sisavaca ukazale su na složeni slijed ranih embrionalnih događaja koji se odvijaju iznad proliferativnog neuroepitela. Neuroni različitih molekularnih obilježja, od kojih neki imaju porijeklo van korteksa, naseljavaju zadebljani sloj ispod pijalne površine. Zbog njegove složene stanične organizacije i činjenice da taj sloj prethodi stvaranju kortikalne ploče, taj sloj je nazvan primordijalni pleksiformni sloj (Rakic, 1974b, Rickmann i Wolff, 1981, Marin-Padilla, 1983, Stewart i Pearlman, 1987, Super i sur., 1998). No, 2008. godine Bystron i suradnici predlažu da se taj sloj heterogenih postmigratornih stanica i neuropil koji nastaje između proliferativne zone i pijalne površine dorzalnog telencefalona prije formiranja kortikalne ploče definira kao pred-ploča (PPL, engl. *preplate layer*). Izvorno poimanje preplate sloja, ili primordijalnog pleksiformnog sloja, čije se stanice (rano rođene Cajal-Retziusove stanice i subplate neuroni) dolaskom neurona kortikalne ploče podijele na marginalni sloj i sloj pod pločom (Marin-Padilla, 1978) nije dokazano niti histološkim niti imunohistokemijskim metodama. Stoga je klasični preplate koncept temeljen na Golgi istraživanjima, upotrebom imunohistokemije i pojavom neurokemijskih biljega različitih tipova stanica promijenjen i prilagođen moždanoj kori ljudi (Meyer i sur., 2000), primata (Smart i sur., 2002) i glodavaca (Meyer i sur., 1998). U ljudskim embrijima, ovaj sloj se neprestano mijenja dolaskom novih stanica tijekom različitih razvojnih razdoblja (Zecevic i Milosevic, 1997, Meyer i sur., 2000, Zecevic i Rakic, 2001, Meyer i sur., 2002, Rakic i Zecevic, 2003b). Gundela Mayer (2000) opisala je da se tijekom



**Slika 1.5 Dijagram razvojnih događanja u stijenci embrionalnog telencefalona prije stvaranja kortikalne ploče (Carnegie stadij 16-22).**

Plavo, Reelin; svjetlo zeleno, rane kalretinin pozitivne stanice u monosloju; crveno, GAD pozitivni neuroni monosloja; tamno zeleno, pionirske stanice; žuto, neuroni kortikalne ploče. Prvi reelin pozitivni neuroni pojavljuju se u CS16 i njihove se broj povećava od CS17 do 19. Prve kalretinin pozitivne stanice pojavljuju se u CS 19 u preplate sloju. Zajedno sa GAD pozitivnim neuronima, koji se pojavljuju u CS20, čine monosloj unutar preplate sloja. CR stanice se smještaju subpikalno. U CS21 pionirska ploče se nakuplja ispod monosloja i šalje prva kortikofugalna vlakna. U CS21/22 prva kohorta neurona kortikalne ploče razdvaja pionirsku ploču na manji površinski odjeljak i veći, dublji odjeljak. Preuzeto iz Meyer 2007.

Carnegie stadija 16 prvi neuroni koji sintetiziraju protein reelin pojavljuju u uskoj marginalnoj zoni (slika 1.5). Unutar tog sloja, u Carnegie stadiju 19/20, stanice koje izražavaju kalretinin i/ili GAD, ali ne i reelin, stvaraju monosloj koji premješta reelin pozitivne stanice u subpialni sloj. U Carnegie stadiju 21 ispod monosloja nakupljaju se okrugli neuroni koji su kalretinin pozitivni, ali GAD i reelin negativni (engl. *pioneer neurons*). Ovu početna "pionirska ploča" naseljava sve veći broj kalretinin negativnih neurona koji predstavljaju prvu kohortu kortikalne ploče i smještaju se između površinskih i dubokih pionirskih neurona. Površinski pionirski neuroni se prorjeđuju, vjerojatno stoga što pripadaju ograničenoj populaciji stanica koju će raspršiti rastuća kortikalna ploča. Uz povećanje broja, duboki pionirski neuroni poprimaju piramidni oblik i stvaraju osnovu sloja pod pločom, odnosno presubplate prema terminologiji Kostovića i Rakica (1990). Kostović i Rakic opisali su kod čovjeka i majmuna da velika većina rano generiranih neurona smještenih između marginalne i intermedijalne zone, prije pojave kortikalne ploče, bude uključena u subplate zonu, no nisu opisali postojanje histološkog preplate sloja (Kostović i Rakic, 1990). Također, kod čovjeka manje od 10% subplate neurona potječe od preplate, dok kod miša većina neurona koja se trajno smješta u subplate zoni potječe od preplate (Kostović i sur., 2013).

No, čak i prije potpunog zatvaranja rostralnog neuroporusa, ispod pialne površine se nalaze horizontalno poredani i gusto postavljeni neuroni s dugačkim horizontalnim nastavcima koji predstavljaju preteču neuralne mreže palijuma (engl. *predecessor cells*). Čini se da ovi neuroni ne potječu iz proliferativnih zona telencefalona, već migriraju iz drugih dijelova neuralne cijevi (pretpostavlja se da dolaze iz graničnog područja između mezencefalona i prozencefalona). Ti su neuroni dosada opisani isključivo u čovjeka, dok kod miša nisu uočeni (Bystron i sur., 2006). Tako brojna i razvijena mreža neurona tijekom najranijih stadija embrionalnog razvoja do sada je opisana samo u fetusa čovjeka.

### **1.2.2.2 Slojevi stijenke telencefalona nakon stvaranja kortikalne ploče**

#### **1.2.2.2.1 Ventrikularna i subventrikularna zona**

Tijekom fetalnog razvoja smanjuje se širina ventrikularne zone istovremeno s povećanjem subventrikularne zone. Nakon što se tijekom 7. tjedna nakon začeća pojavi subventrikularna zona, njezina debljina se povećava u lateromedijalnom smjeru. Tijekom evolucije dolazi do značajnog povećanja subventrikularne zone te je njezina stanična organizacija u primata znatno različita nego kod glodavaca (Smart i sur., 2002, Zecevic i sur., 2005, Dehay i Kennedy, 2007). Za razliku od miša gdje je subventrikularna zona puno diskretnija od ventrikularne i većinom izvor glija stanica, kod čovjeka ona postaje glavni izvor kortikalnih neurona te proizvodi većinom interneurone, subplate neurone i neurone supragranularnih slojeva moždane kore (Letinic i sur., 2002, Smart i sur., 2002, Rakic, 2003a, Zecevic i sur., 2005). Promjene subventrikularne zone u primata su toliko izražene da oko 12. tjedna nakon začeća (oko E72 u majmuna) sloj urastajućih vlakana jasno odvoji subventrikularnu zonu od ventrikularne zone i najdubljeg dijela subventrikularne zone (iSVZ) stvarajući iznimno voluminoznu vanjsku subventrikularnu zonu (oSVZ). Ona je kod primata zapravo daleko najveći spremnik neuronalnih progenitora, a u miša ne postoji niti u rudimentarnom obliku. Općenito, subventrikularnu zonu ne nalazimo u arhikorteksu i paleokorteksu, kao niti u vrsta koje imaju samo takvu kortikalnu organizaciju. Kod ljudi, veliki broj radijalnih glija stanica i intermedijalnih preteča naseljava vanjsku subventrikularnu zonu. Radijalne glija stanice u vanjskoj subventrikularnoj zoni imaju dugačke bazalne nastavke, ali nemaju kontakt sa ventrikularnom površinom. Podliježu procesu samoobnavljajuće asimetrične diobe stvarajući preteče neurona koje se dalje dijele, za razliku od intermedijalnih preteča u subventrikularnoj zoni glodavaca koje se podijele samo jednom (Kriegstein i sur., 2006, Hansen i sur., 2010).

Pretpostavlja se da neurogeneza u ventrikularnoj zoni čovjeka završava oko 18. tjedna nakon začeća (Rakic i Sidman, 1968, Rakic, 1995). U razdoblju od 18. do 24. tjedna nakon začeća, subventrikularna zona je jedino mjesto neurogenze za moždanu koru, a u tom razdoblju se stvaraju neuroni za supragranularne slojeve moždane kore (Zecevic i sur., 2005) (Zecevic i sur. 2005). Nakon 24. tjedna bitno slabe i prestaju procesi neurogenze. No, noviji eksperimentalni i deskriptivni podaci pokazuju da se određene populacije neurona mogu stvarati i nakon ovog razdoblja, što ima bitne kliničke implikacije kod prematurusa (Riccio i sur., 2012, Malik i sur., 2013, Hladnik i sur., 2014, Arshad i sur., 2016).



#### **1.2.2.2.2 Intermedijalna zona**

Područje ograničeno s jedne strane zonama proliferacije, a s druge strane kortikalnom pločom, odnosno subplate zonom nakon njezinog formiranja naziva se intermedijalnom zonom. Ta je zona ispunjena tangencijalno usmjerenim aksonima, migrirajućim neuronima i radijalnim nastavcima radijalnih glijalnih stanica (Bystron i sur., 2008). Tijekom razvoja dolazi do povećanja širine intermedijalne zone koje je posebno izraženo u kortikalnim regijama u blizini ganglijskog brežuljka i kapsule interne, dok je intermedijalna zona u području medijalnog zatiljnog režnja i cingularnog korteksa uža. Na temelju gustoće i usmjerenja vlakana obilježenih kalbindinom i kalretininom, intermedijalna zona se može podijeliti u donji i gornji sloj. Granicu između intermedijalne i subplate zone čini gusti horizontalni snop vlakana koji ukazuje na položaj kapsule eksterne (Kostović i sur., 2002). Po završetku migracije intermedijalna zona se pretvara u bijelu tvar odraslog mozga te se stoga naziva i fetalnom bijelom tvari.

#### **1.2.2.2.3 Subplate zona**

Razvoj sloja pod pločom može se podijeliti u četiri stadija: a) presubplate stadij, b) stadij formiranja subplate zone, c) stadij razvijene subplate zone i d) stadij postupnog nestanka subplate zone (Kostović i Rakic, 1990).

Najranije naznake subplate zone mogu se vidjeti oko 12. tjedna nakon začeća ispod kortikalne ploče kao uski pojas tkiva s rijetko raspoređenim stanicama, bogat dendritima i aksonima orijentiranim u različitim smjerovima i malim brojem asimetričnih sinapsi (presubplate). Oko 13. tjedna nakon začeća počinje se formirati subplate zona. Gustoća stanica u dubokim dijelovima kortikalne ploče se smanjuje i postupno transformira u gornji subplate podsloj, koji nalikuje na rahli, raspršeni duboki dio kortikalne ploče, i donji subplate podsloj. Oko 15. tjedna nakon začeća subplate zona je formirana. U razdoblju između 16. i 24. tjedna nakon začeća subplate zona je izrazito dobro razvijena te klasičnim histološkim metodama jasno razgraničena kao poseban sloj koji je u telencefalonu nekoliko puta deblji od kortikalne ploče. To znači da neuroni preplate sloja koji ostaju ispod kortikalne ploče i tvore primordijalni subplate (presubplate) predstavljaju vrlo malen broj neurona koji oblikuju subplate zonu tijekom sredine trudnoće te je očigledno da velika većina neurona subplate zone nastaje kondenzacijom kortikalne ploče između 12. i 16. tjedna nakon začeća. No, treba spomenuti da osim iz ova dva izvora, dodatan broj neurona tijekom cjelokupnog ranog i srednjeg fetalnog razdoblja migrira iz proliferativnih zona u subplate zobu gdje zauzme svoj konačni položaj. Stoga subplate zona kod čovjeka i majmuna nije ostatak rane preplate

zone, nego se javlja kasnije, nakon nastanka kortikalne ploče i sadrži puno više fenotipski raznovrsnijih subpopulacija neurona.

Svi kortikalni neuroni, izuzev tangencijalno migrirajućih neurona marginalne zone koji oblikuju subpijalni granularni sloj, prolaze kroz subplate zonu. Međutim, subplate zona (kao i marginalna zona) sadrži i najranije diferencirane projekcijske glutamatergične neurone i lokalne GABA-ergičke i peptidergičke interneurone. Subplate neuroni su morfološki razvijeniji od neurona moždane kore. Njihovi su dendriti dulji od dendrita kortikalnih neurona sve do 32. tjedna nakon začeća (Mrzljak i sur., 1992). Između 17. i 25. tjedna nakon začeća doalzi do intenzivne diferencijacije subplate neurona, dok su razne skupine aferentnih aksona smještene u subplate zoni (Mrzljak i sur., 1988, 1992). S obzirom na to da subplate zona ima zrele neurone što sintetiziraju različite neurotransmitere i neuropeptide, u vrijeme dok su neuroni infragranularnih slojeva vrlo nezreli, a oni za površinske dijelove kortikalne ploče tek nastaju i/ili migriraju, subplate zona ima ključnu ulogu u reguliranju urastanja aksona u kortikalnu ploču, a time i u sinaptogenezi, diferencijaciji i arealnoj specifikaciji kortikalne ploče. Subplate zona je glavno mjesto rane sinaptogeneze jer sadrži obilje sinapsi u ranom razdoblju, u kojem kortikalna ploča još uopće nema sinapsi te služi kao "čekaonica" za različite sustave aferentnih aksona koji uspostave privremene sinapse na neuronima subplate zone i tu "čekaju" 2-3 mjeseca, a tek potom počnu urastati u samu kortikalnu ploču (između 24. i 28. tjedna nakon začeća).

Faza najveće razvijenosti subplate zone je između 20. i 35. tjedna nakon začeća. Debljina subplate zone je četiri puta veća od debljine kortikalne ploče te ona čini najdeblji dio stijenke fetalnog telencefalona. U ovom razdoblju elementi kortikalnih neuronskih krugova (aferentni aksoni, sinapse i postsinaptički neuroni) imaju privremeni slojeviti raspored i privremena histokemijska i neurotransmitterska svojstva te čine neurobiološku podlogu privremenih oblika funkcionalne aktivnosti i obrazaca ponašanja u nedonoščadi (Kostović i Judaš, 2002, Kostović i Judaš, 2002, Kostović i Judaš, 2006, 2007, 2010). Oko 35. tjedna nakon začeća započinje postupno nestajanje subplate zone i to prvo u dubini sulkusa, a tek nakon toga u krunama vijuga. U asocijacijskim područjima moždane kore subplate zona je nazočna tijekom prvih 6 postnatalnih mjeseci. No, subplate neuroni ne nestaju sa subplate zonom, nego ostaju u odrasloj dobi kao dio funkcionalne neuralne mreže bijele tvari (intersticijski neuroni) i subkortikalnog sloja VI (sloj VIb) (Kostović i Rakic, 1980, 1990).

#### **1.2.2.2.4 Kortikalna ploča**

Kortikalna ploča je razvojna osnova budućih kortikalnih slojeva II do VI. Nastaje tijekom 7. tjedna nakon začeća (Bystron i sur., 2008) pristizanjem migrirajućih postmitotičkih neurona koji iz ventrikularne i subventrikularne zone putuju radijalnom i tangencijalnom

migracijom do svog konačnog odredišta u kortikalnoj ploči. Proces migracije neurona i organizacije korteksa odvija se iznutra prema van (eng. *inside-out*): mlađi, odnosno kasnije stvoreni neuroni, migriraju kroz sloj starijih neurona i smještaju se iznad njih, bliže pijačnoj površini. Drugim riječima, neuroni dubljih slojeva su stariji od neurona površinskih slojeva (Angevine i Sidman, 1961, Rakic, 1974a). Molekularni fenotip te arealna i laminarna pripadnost neurona moždane kore određeni su trenutkom rođenja u ventrikularnoj i subventrikularnoj zoni (Rakic, 1988, Krubitzer i Kaas, 2005, Shen, 2006).

Razvoj kortikalne ploče može se podijeliti u nekoliko stadija: a) stadij početnog oblikovanja kortikalne ploče (stadij I: 6-10PCW, E40-E54 kod majmuna); b) primarna kondenzacija kortikalne ploče (stadij II: 10-11PCW, E55-E59 kod majmuna); c) bilaminarna kortikalna ploča (stadij III: 11-13PCW, E59-E64 kod majmuna); d) sekundarna kondenzacija kortikalne ploče (stadij IV: 13-15PCW, E64-E75 kod majmuna) e) produljeni stadij kortikalnog sazrijevanja (stadij V: od 16PCW do u postnatalno razdoblje) (Poliakov, 1959, 1965, Sidman i Rakic, 1973, Kostović-Knežević i sur., 1978, Sidman i Rakic, 1982, Nemani i sur., 1984, Rakic i sur., 2009a).

Pristizanjem postmitotičkih stanica iz ventrikularne zone tijekom 7. tjedna nakon začeca započinje stadij početnog oblikovanja kortikalne ploče. Sredinom stadija I, uočavaju se prve sinapse iznad i ispod kortikalne ploče (Molliver i sur., 1973, Zecevic, 1998). U idućem stadiju, tijekom 10. i 11. tjedna, povećava se debljina kortikalne ploče te ona postaje kompaktna, oštro ograničena (od vlaknima bogatog dijela intermedijalne zone) zona s izraženom radijalnom (stupićastom ili kolumnarnom) orijentacijom stanica. Nakon 11. tjedna nakon začeca, jednolična i zbijena kortikalna ploča podijeli se u unutrašnji sloj u kojem se nalaze stanice s relativno velikim ovalnim jezgrama i vanjski sloj stanica s gusto zbijenim, tamnim, bipolarnim jezgrama. Nakon otkrića subplate zone (Kostović i Molliver, 1974), postaje očito da stadij III razvoja kortikalne ploče odgovara početnom stadiju formiranja sloja pod pločom, odnosno stadiju sekundarne kortikalne ploče (Kostović i Rakic, 1990). Nakon 13. tjedna kortikalna ploča opet postaje homogena, i nalikuje na zadebljalu ploči iz stadija II. Tijekom stadija sekundarne kondenzacije kortikalne ploče, ventrikularna zona postaje sve tanja, subventrikularna ostaje relativno široka, a subplate zona se dodatno povećava. U 16. tjednu nakon začeca započinje produljeni stadij kortikalnog sazrijevanja koji se proteže u postnatalno razdoblje. Vrhunac migracije neurona za kortikalnu ploču zbiva se između 12. i 20. tjedna nakon začeca, a početkom trećeg tromjesječja završava migracija svih kortikalnih neurona (Sidman i Rakic, 1973, Rakic i sur., 1994, Gressens, 2000, Bystron i sur., 2008). Do kraja sedmog mjeseca trudnoće kortikalna se ploča zajedno s marginalnom zonom pretvori u univerzalnu šestoslojnu moždanu koru. Regionalna i arealna diferencijacija moždane kore započinje između šestog i osmog mjeseca trudnoće (Brodmann, 1908) pa nakon toga postupno nastaju razlike u citoarhitektonskoj građi različitih polja i područja moždane kore

(primjerice veličina i oblik stanica, broj slojeva) na kojima se temelje različite citoarhitektonske mape moždane kore (Bystron i sur., 2008). No, procesi diferencijacije kortikalnih neurona i uspostave sinapsi nastavljaju se i nakon rođenja.

#### 1.2.2.2.5 Marginalna zona

Fetalna zona smještena ispod pijalne površine naziva se marginalna zona. Prema Bystron i suradnicima (2008) naziv marginalna zona trebao bi se koristiti nakon nastanka kortikalne ploče. Kod primata dolazi do povećanja i usložnjavanja marginalne zone, a vrijeme nastanka neurona marginalne zone se bitno razlikuje u glodavaca i primata. Dok se svi neuroni marginalne zone glodavaca stvore prije pojave kortikalne ploče (Jimenez i sur., 2003), u primata se njihova neurogeneza nastavlja i nakon pojave kortikalne ploče, tijekom prve dvije trećine trudnoće (Kostović i Rakic, 1990, Zecevic i Rakic, 2001, Rakic i Zecevic, 2003a). U razdoblju od 18. do 28. tjedna nakon začeća, ovaj sloj pokazuje složenu šesteroslojnu staničnu organizaciju te se, od pije prema kortikalnoj ploči, mogu razaznati sljedeći slojevi: (1) stanicama siromašna marginalna pruga (*Randstreifen*); 2) subpijalni granularni sloj (SGL, engl. *subpial granular layer*); 3) marginalna zona u užem smislu (MZP, engl. *marginal zone proper*); 4) *stratum lucidum* (SL); 5) duboki granularni sloj (DGL, engl. *deep granular layer*); 6) *stratum radiatum* (SR). Neki od ovih slojeva su prolazni fetalni slojevi te ovakva sublaminacija nije vidljiva u mozgu novorođenčeta (Kostović i sur., 2004). Subpijalni granularni sloj vidljiv je između 12. i 34. tjedna nakon začeća, stratum lucidum od 20. do 28, a duboki granularni sloj između 15. i 34. tjedna nakon začeća. Tijekom razvoja, marginalna zona se pretvori u sloj I moždane kore u kojem se nalaze završeci apikalnih dendrita piramidnih neurona i poneki neuron.

Posebnost ljudske marginalne zone je i pojava vrlo izraženog sloja ispod pije, subpijalnog granularnog sloja. Njega tijekom 11. tjedna nakon začeća oblikuju tangencijalno migrirajući neuroni porijeklom iz bazalne periolfaktorne subventrikularne zone koji se u iduća dva mjeseca raspodijele po cijeloj površini mozga, da bi zatim ovaj sloj progresivno nestao tijekom trećeg trimestra (nestajanje počinje nakon 28. tjednu, dok u 34. tjednu nakon začeća sloj više nije vidljiv). Podaci o proliferativnoj aktivnosti u telencefalonu mačke i majmuna najviše govore u prilog da se radi o sloju kojega tvore migratorni interneuroni koji će zatim ući u kortikalnu ploču (Zecevic i Rakic, 2001). Kod čovjeka subpijalni granularni sloj je između 13. do 24. tjedna nakon začeća debljine 3 do 4 reda stanica, dok je u miša prisutan vrlo kratko te je sačinjen od samo jednog sloja stanica (Brun 1965, Gadisseux i sur. 1992, Meyer i Goffinet 1998, Rakic i Zecevic 2003, Bystron i sur. 2008, Judaš i Pletikos 2010.).

Marginalna zona sadrži i posebnu populaciju krupnih fetalnih neurona, Cajal-Retziusovih stanica (Krmpotić-Nemanić i sur., 1987, Meyer i Gonzalez-Hernandez, 1993,

Verney i Derer, 1995, Meyer i Goffinet, 1998, Meyer i sur., 1999, Meyer i Wahle, 1999, Meyer i sur., 2000, Meyer i sur., 2002, Abraham i sur., 2004, Cabrera-Socorro i sur., 2007, Meyer, 2010). Ovi neuroni sintetiziraju protein reelin, bitan sastojak izvanstaničnog matriksa te stoga imaju iznimno važnu ulogu u uspostavi ispravne laminacije moždane kore (Meyer i sur., 1999, Tissir i Goffinet, 2003, Meyer, 2010). Glavno mjesto porijekla Cajal-Retziusovih stanica je kortikalni hem, a dio populacije ovih stanica vjerojatno ima porijeklo i u talamičkom brežuljku u području ventralnog talamusa te u amigdalarnom hemu (Meyer, 2010).

Prve Cajal-Retziusove stanice mogu se kod čovjeka uočiti u 7. tjedna nakon začeća (Larroche, 1981, Larroche i Houcine, 1982). One eksprimiraju reelin te se njihov broj povećava nakon nastanka kortikalne ploče (Meyer, 2010). Već oko 14. tjedna nakon začeća u marginalnoj zoni mogu se uočiti Cajal-Retziusove stanice koje sintetiziraju neuropeptid Y, a nakon 36. tjedna nakon začeća postaju vrlo rijetke (Uylings i Delalle, 1997). Tijekom sredine trudnoće, većina Cajal-Retziusovih stanica izražava kalbindin i kalretin (Verney i Derer, 1995, Yan i sur., 1995) te poneke parvalbumin (Verney i Derer, 1995, Cao i sur., 1996). U novorođenčeta, u sloju I nalaze se Cajal-Retziusove stanice koje izražavaju parvalbumin i pokazuju znakove degeneracije (Ding i sur., 2000).

Kako neka novija istraživanja pokazuju da one po završetku migracije degeneriraju i umiru, Cajal-Retziusove stanice mogle bi biti jedina populacija prolaznih stanica u mozgu čovjeka (Meyer, 2010). Međutim, neka istraživanja ne idu tome u prilog te postoji debata o njihovom postnatalnom postojanju (Marin-Padilla, 1984, 1988, Marín-Padilla, 1992, Marin-Padilla, 1998). Zanimljivo je da u prefrontalnom korteksu čovjeka, za razliku od okcipitalnog, Cajal-Retziusove stanice diferenciraju i rastu sve do rođenja te da tijekom prve godine života ne pokazuju znakove veće regresije dendrita. Ovo je sličan obrazac rasta dendrita koji je uočen kod neurona u subplate zoni (Mrzljak i sur., 1992). Cajal-Retziusove stanice mogu se uočiti i tijekom adolescencije, ali ne i kasnije. Također, podaci ne ukazuju na dramatičan gubitak ovih stanica sve do adolescencije (Kostović i sur., 2013).

Treba napomenuti kako su Cajal i Retzius opisivali stanice od sredine pa do kraja trudnoće, dok se danas uvriježilo da se termin Cajal-Retziusove stanice koristi za velike subpialno smještene stanice koje u ranim fetalnim razdobljima ulaze u marginalnu zonu. Kako je rasprava o tome radi li se ovdje doista o Cajal-Retziusovim stanicama, a ovaj rad obuhvaća razdoblje prve polovice trudnoće, ovdje se koristio termin rane Cajal-Retziusove stanice.

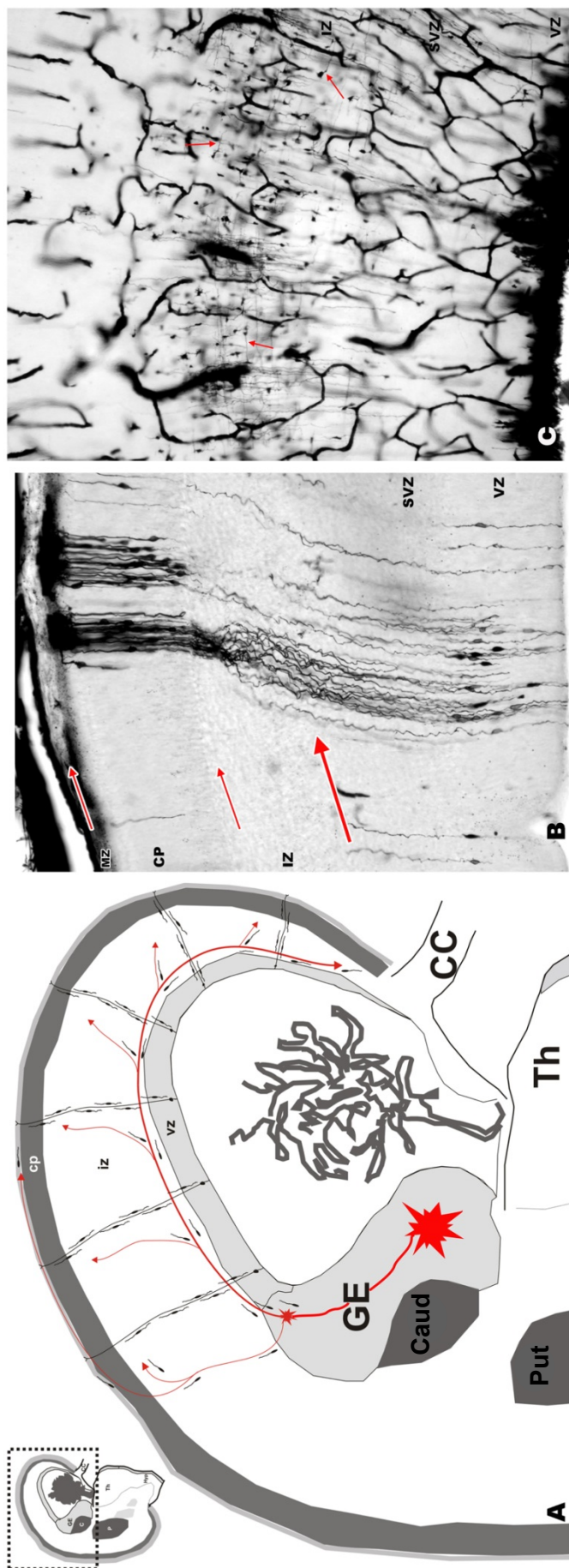
### 1.2.3 MIGRACIJA

Kortikalni (postmitotički) neuroni rađaju se u ventrikularnoj i subventrikularnoj zoni te putuju do svojeg konačnog odredišta. Projekcijski, glutamatergički piramidni neuroni radijalno migriraju, dok GABA-ergički neuroni lokalnih neuronskih krugova (interneuroni) tangencijalno migriraju (slika 1.6). U ranijim stadijima razvoja prelaze relativno kratke udaljenosti, no u kasnijim fetalnim stadijima te udaljenosti dostižu duljinu od nekoliko centimetara (Kolasinski i sur., 2013). Stoga je migracija neurona veoma složen proces reguliran pravilnim slijedom aktivacije velikog broja gena, na što mogu utjecati brojni i različiti vanjski čimbenici. Proces migracije vrlo je intenzivan gotovo tijekom cijele trudnoće (Judaš i Kostović, 1997), a sindromi koji nastaju kao posljedica poremećene migracije mogu uzrokovati preuranjenu smrt fetusa, epileptične napadaje te suptilne promjene u funkcioniranju mozga (Gleeson i Walsh, 2000, Ross i Walsh, 2001, Kostović i sur., 2007).

Koncept da kortikalni neuroni putuju od mjesta podrijetla u blizini moždanih klijetki do svojeg konačnog odredišta u kori velikog mozga otkriven je tek prije jednog stoljeća, pažljivim promatranjem i domišljatim tumačenjem onoga što se vidjelo na rezovima embrionalnog ljudskog tkiva obojenima klasičnim histološkim metodama (Rakic, 2006). Iako se na klasičnoj opće prihvaćenoj Rakicevoj shemi razvojnih događanja u telencefaličkom zidu (Rakic, 1971) opažaju i radijalno i tangencijalno migrirajući neuroni, u tri desetljeća koja su uslijedila gotovo cjelokupan naglasak u istraživanju bio je na radijalnoj migraciji, migraciji okomitoj na ventrikularnu i pijalnu površinu. Da je tangencijalna migracija važan proces kojime druga velika populacija neurona dolazi na svoje odredište, postalo je jasno i opće prihvaćeno tek prije petnaestak godina.

#### 1.2.3.1 Radijalna migracija

Mladi, nezreli postmitotički neuroni migriraju kroz vrlo složenu tkivnu mrežu te su im pri tome potrebni i posebni vodiči. Ti vodiči su radijalne glijalne stanice, razapete poput užadi od ventrikularne do pijalne površine fetalnog mozga. Migrirajući neuroni uspostavljaju složenu molekularnu interakciju s radijalnom glijom pri čemu zapravo pužu uz nju. Migracija se u pravilu odvija u radijalnom smjeru, prema površini neuralne stijenke (migracija "prema van"). Stanice rođene u različito vrijeme, ali na istom mjestu u proliferativnoj zoni telencefalona, migriraju duž istih radijalnih vodiča i završavaju u osnovi moždane kore jedne iznad drugih: prvi neuroni koji dolaze u kortikalnu ploču su neuroni dubokih slojeva, a svaki sljedeći val migrirajućih neurona smješta se površnije, zauzimajući položaj između prethodno oblikovanog sloja i marginalne zone (princip „iznutra prema van“). Iznimku od pravila iznutra prema van čine neuroni sloja I. Naime, proliferacijska zona je mozaik proliferacijskih jedinica,



**Slika 1.6 Radijalna i tangencijalna migracija kortikalnih neurona.**

(A) Shematizirani prikaz migracije kortikalnih neurona na frontalnom presjeku telencefalona ljudskog fetusa u 14. tjednu nakon začeća. Ekscitacijski projekcijski (piramidni) neuroni imaju bipolarnu morfologiju i migriraju okomito na površinu mozga uz radijalno usmjerena glijalna vlakna (radijalna migracija). Većina kortikalnih inhibicijskih GABA-ergičkih interneurona migrira tangencijalno do odredišta. Unipolarni neuroni, budući interneuroni, kreću se paralelno s površinom mozga (crvena strelica) i moraju prijeći veću udaljenost nego radijalno migrirajući neuroni (tanke crvene strelice). (B) Mikrofotografija Golgi metodom impregniranih rezova kroz stijenku dorzalnog telencefalona u 10. tjednu nakon začeća. Bipolarno migrirajući, budući projekcijski neuroni najjače su impregnirani u ventrikularnoj i subventrikularnoj zoni. Brojni izdanci radijalne glije protežu se od klijetke do pije, a u kortikalnoj ploči vidljivi su i brojni budući projekcijski piramidni neuroni na početku procesa diferencijacije. Crvene strelice pokazuju mjesta najvećih nakupina i smjer tangencijalno migrirajućih stanica. (C) Mikrofotografija Golgi metodom impregniranih rezova kroz stijenku dorzalnog telencefalona u 12. tjednu nakon začeća. Unipolarni, neradijalno orijentirani budući interneuroni čine tangencijalno migrirajuće nakupine u donjem dijelu intermedijalne i gornjem dijelu subventrikularne zone. Crvene strelice pokazuju tangencijalno migrirajuće stanice. Modificirano prema Kostović i sur. 2007.

a svi postmitotički neuroni nastali iz jedne takve jedinice su poliklon i migriraju duž istih radijalnih vodiča te oblikuju morfološki prepoznatljiv stupićasti skup neurona u kortikalnoj ploči - ontogenetsku ili embrionalnu kolumnu. To znači da je položaj neurona u određenom sloju buduće moždane kore (radijalni položaj) određen njegovim rođenjem i brzinom migracije, dok je pripadnost određenoj embrionalnoj kolumni (tangencijalni položaj) određena međusobnim rasporedom proliferacijskih jedinica u ventrikularnoj zoni. Ovakav princip organizacije proliferativnih zona koje predstavljaju presliku budućih kortikalnih kolumni naziva se „protomapa“, a princip migracije putem radijalne glije naziva se radijalna migracija (Rakic, 2006).

Razlikuju se dvije vrste radijalne migracije: lokomotorna migracija i nuklearna translokacija. Nuklearna translokacija podrazumijeva putovanje neurona prema piji bez korištenja radijalne glije za potporu. Nakon što pomoću mikrotubula pruži vodeći izdanak citoplazme prema pijalnoj površini, cijela se stanica pomiče prema tom izdanku po principu opruge pomoću intermedijalnih filamenata (Miyata i Ogawa, 2007, Huang, 2009). Iako je translokacija dominantan način migracije u ranoj fazi, neuroni koji migriraju lokomotorno u kasnijim fazama posljednji dio puta također prelaze translokacijski. Nuklearna translokacija je brža te se stanice kreću stalnom brzinom bez prekida, a napredovanjem procesa stanica se skraćuje kako se približava površini (Nadarajah i sur., 2001). Lokomotorna migracija podrazumijeva složenu molekularnu interakciju migrirajućeg neurona s radijalnom glijom pri čemu zapravo neuroni pužu uz radijalnu gliju. Lokomotorna migracija započinje nešto kasnije u razvoju fetusa. Neuroni koji tako migriraju pomiču se nejednako, izmjenjujući razdoblja brzog i sporog kretanja. Kada neuroni stignu do kortikalne ploče, prelaze na translokacijski način migracije (Nadarajah i sur., 2001). U procesu migracije vrlo važnu ulogu ima populacija Cajal-Retziusovih stanica koje izlučuju izvanstanični protein reelin, koji pokretanjem brojnih mehanizama negativne sprege privlači neurone prema površini i zaustavlja ih kada prijeđu prijašnji sloj neurona te je stoga odgovoran za normalnu slojevitost neurona u kortikalnoj ploči (Nadarajah i sur., 2001).

Tijekom kortikogeneze, radijalne glija stanice u ljudskom i majmunskom mozgu sadrže kiseli glijalni fibrilarni protein (GFAP) te se razlikuju od GFAP-negativnih stanica (Antanitus i sur., 1976, Choi i Lapham, 1978, Levitt i Rakic, 1980, Levitt i sur., 1981, 1983, Choi, 1986, Kadhim i sur., 1988, deAzevedo i sur., 2003). Također, intermedijalni filament vimentin je koristan biljeg u identifikaciji radijalnih glija stanica u primata, jer su susjedni neuroni vimentin-negativni. Za razliku od primata, radijalna glija u glodavaca nije GFAP pozitivna, sve do završetka kortikoneurogeneze (Cameron i Rakic, 1991) kada dolazi do promjene u razvojnem fenotipu te se vimentin zamjenjuje GFAP-om (Rakic, 2003a, b). Kod primata, radijalne glija stanice eksprimiraju i GFAP i vimentin tijekom najmanje dvije trećine gestacije (Antanitus i sur., 1976, Choi i Lapham, 1978, Levitt i sur., 1981, Choi, 1986, Sasaki



i sur., 1988, Stagaard i Mollgard, 1989, Wilkinson i sur., 1990, Sarnat, 1992, Honig i sur., 1996, Zecevic i sur., 1999, deAzevedo i sur., 2003).

Radijalna glija u primata ima složenija i raznovrsnija morfološka obilježja nego kod glodavaca. U primata radijalne glija stanice dostižu vrhunac u veličini i fenotipskoj diferencijaciji (Schmechel i Rakic, 1979a, Levitt i Rakic, 1980, Levitt i sur., 1981, 1983, Rakic, 2003a, b). Postoje značajne strukturalne, molekularne i funkcionalne razlike u radijalnim glija stanicama između različitih regija unutar iste vrste, kao i između iste regije različitih vrsta (Rakic, 2003a, b). Primjerice, duljina vlakna radijalne glija stanice u mozgu makaki majmuna pred kraj kortikoneurogeneze može doseći 3 do 7 mm (Rakic, 1972). U tom stadiju, mnoge se radijalne glija stanice prestanu dijeliti dok služe kao vodiči migratornim neuronima (Schmechel i Rakic, 1979a, b). Nekoliko generacija GFAP negativnih migrirajućih neurona može puzati uz jedan nastavak GFAP pozitivine radijalne glija stanice, a taj se broj povećava s gestacijskom dobi (Rakic, 2003a, b). Tako primjerice u širokoj intermedijalnoj zoni ljudskog fetusa tijekom midgestacije, 30 generacija migrirajućih neurona može biti poredano uz jedan nastavak radijalne glija stanice (Sidman i Rakic, 1973, 1982).

Vrhunac radijalne migracije neurona odvija se od 3. do 5. mjeseca trudnoće (Sidman i Rakic, 1973), pa se obično smatra da je u 28. tjednu nakon začeća većina projekcijskih glutamatergičkih neurona pristigla na svoje krajnje odredište u kortikalnoj ploči (Sidman i Rakic, 1973, Gressens, 2000).

### **1.2.3.2 Tangencijalna migracija**

Osim nezrelih, bipolarnih, radijalno orijentiranih neurona, u telencefalonu se tijekom migracije nalaze brojni unipolarni, neradijalno orijentirani neuroni, većinom u položaju paralelnom s pijalnom površinom (Stensaas, 1968). Tek se krajem prošlog stoljeća počelo ukazivati da bi se moglo raditi o nezrelim GABA-ergičkim neuronima koji migraju iz subpialnih proliferativnih zona (ganglijskog brežuljka) prema kori velikog mozga (Van Eden i sur., 1989, DeDiego i sur., 1994), prolazeći veću udaljenost od radijalno migrirajućih neurona. Velik broj istraživanja provedenih u posljednjih desetak godina pokazao je da kod tangencijalne migracije neuroni slijede urastajuće aksone (neurofilna migracija) tvoreći slijedove nakupljenih migrirajućih neurona (engl. *migratory stream*) (Anderson i sur., 1997, Pleasure i sur., 2000, Molnar i sur., 2006, Wonders i Anderson, 2006, Heng i sur., 2007, Metin i sur., 2007, Metin i sur., 2008). Najveći slijed nakupljenih tangencijalno migrirajućih neurona prisutan je na granici subventrikularne i intermedijalne zone, dok se kod majmuna i čovjeka, s obzirom na promjene laminacije subventrikularne zone, ta nakupina nalazi između vanjskog i unutarnjeg dijela subventrikularne zone. Veće grupiranje migratornih neurona nalazimo i u subplate zoni i ispod pijalne površine, ali se individualni tangencijalno migrirajući

neuroni mogu zapaziti u svim slojevima fetalnog telencefalona. Također, u majmuna i čovjeka tangencijalno migrirajući neuroni su izrazito brojni u marginalnoj zoni pa tako oblikuju i vrlo izraženi subpijalni granularni sloj.

Nakon što su deskriptivna istraživanja opisala masivne snopove tangencijalno migrirajućih neurona, eksperimentalna istraživanja, pogotovo ona u kojima su korišteni genetski modificirani miševi (Anderson i sur., 1997, Casarosa i sur., 1999, Horton i sur., 1999, Sussel i sur., 1999, Pleasure i sur., 2000, Wonders i Anderson, 2005, Guillemot, 2007, Butt i sur., 2008, Nobrega-Pereira i sur., 2008, Long i sur., 2009) pokazala su da se u miša gotovo svi telencefalički GABA-ergički neuroni stvaraju u proliferativnim zonama subpalijuma koje obilježava izrazito zadebljana subventrikularna zona (ganglijski brežuljak).

Kako se u majmuna i čovjeka dio GABA-ergičkih kortikalnih neurona stvara u dorzalnim (palijalnim) proliferativnim zonama, važno je spomenuti da te stanice ne slijede radijalni princip migracije, već imaju istu unipolarnu morfologiju kao i tangencijalno migrirajuće stanice te najvjerojatnije migriraju istim molekularnim mehanizmima kao i neuroni koji dolaze iz ventralnih (subpalijalnih) zona (Letinic i sur., 2002, Rakic, 2006, Petanjek i sur., 2009a, Petanjek i sur., 2009b, Rakic i sur., 2009b, Jakovcevski i sur., 2010, Zecevic i sur., 2011).

Također, bitno je napomenuti da se pod pojmom tangencijalne orijentacije zapravo govori o neuronima koji ne slijede princip migracije praćenjem radijalne glijе, jer i tangencijalno migrirajući neuroni u određenom trenutku poprimaju radijalno usmjerenje da bi ušli na svoje konačno mjesto u marginalnoj zoni. Eksperimentalni podaci su pokazali da neki tangencijalno migrirajući neuroni prije usmjeravanja u kortikalnu ploču kontaktiraju ventrikularnu površinu i zatim radijalno orijentirani migriraju u nju (Parnavelas, 2000, Parnavelas i sur., 2002). Ovo je jedan od načina kako bi neuroni mogli dobiti konačan signal o laminarnom i arealnom smještaju, s obzirom na to da sadašnje spoznaje uglavnom ukazuju da su i GABA-ergički neuroni molekularno i morfološki određeni trenutkom rođenja, ali da za razliku od projekcijskih glutamatergičkih njihova arealna i laminarna pozicija nije determinirana u tom trenutku (Metin i sur., 2006, Metin i sur., 2008).

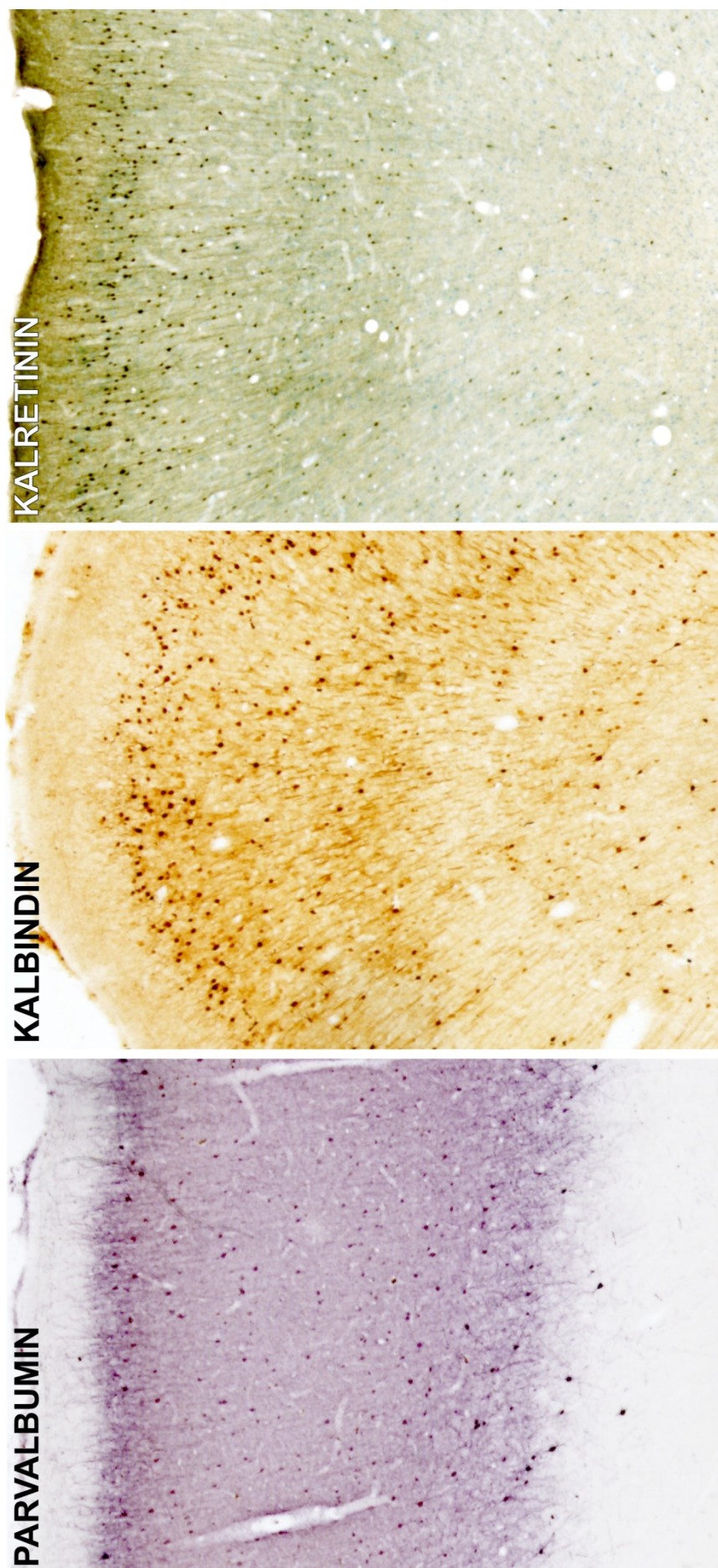
S obzirom na značajno evolucijski promijenjene anatomske odnose u mozgu majmuna i čovjeka te produženo stvaranje GABA-ergičkih interneurona, tangencijalna migracija u primata postaje iznimno složen i osjetljiv događaj. Također, podaci pokazuju da se stvaranje GABA-ergičkih neurona i tangencijalna migracija odvija duže nego radijalna, što dovodi do produženog razdoblja njihove ranjivosti (Petanjek i sur., 2008, Hladnik i sur., 2014, Arshad i sur., 2016). Kada se uzme u obzir njihova ogromna morfološka, molekularna i funkcionalna raznolikost, jasno je koliko je ovaj proces osjetljiv i povezan s brojnim neurološkim i psihijatrijskim poremećajima i odstupanjima.

### **1.3 PROMJENE U ORGANIZACIJI MREŽE KORTIKALNIH GABA-ergičkih NEURONA**

Populacija kortikalnih GABA-ergičkih neurona ima daleko najveći udio u tangencijalno migrirajućim stanicama i kod primata većina, a kod glodavaca gotovo svi, kortikalni GABA-ergički neuroni dolaze do svojeg odredišta tangencijalno migrirajući iz udaljenih područja bazalnog telencefalona. Kortikalni GABA-ergički neuroni čine izrazito heterogenu populaciju neurona s obzirom na molekularna obilježja, funkcionalna svojstva te način projekcije aksona i uspostave veza sa ciljnim neuronima (DeFelipe i sur., 2013). Iako malobrojniji, GABA-ergički neuroni su unutarnji modulatori kortikalne aktivnosti, što postižu izravnom i neizravnom kontrolom prema različitim receptivnim odjeljcima projekcijskih neurona (Jones, 1993). Tako pojedine subpopulacije GABA-ergičkih neurona uspostavljaju sinapse na početnom dijelu aksona, neke prvenstveno na tijelu i početnim dijelovima dendrita, dok se pojedine subpopulacije projiciraju prvenstveno prema središnjim i distalnim dijelovima dendritičkog stabla piramidnih neurona (DeFelipe i sur., 2013). Također, dio kortikalnih GABA-ergičkih neurona se isključivo projicira na druge GABA-ergičke neurone te je konačan učinak ovih neurona na piramide zapravo disinhibicija, za razliku od GABA-ergičkih neurona koji piramide kontaktiraju izravno (Caputi i sur., 2009). Ove glavne grupe GABA-ergičkih neurona definirane prema projekciji njihovih aksona, mogu se dalje podijeliti u podskupine na osnovi svojih vrlo različitih elektrofizioloških svojstava. Dodatna heterogenost prisutna je i u izražavanju različitih molekularnih biljega (Markram i sur., 2004, Ascoli i sur., 2008, DeFelipe i sur., 2013). Između klasifikacije na temelju molekularnih obilježja i projekcije aksona postoji dobra korelacija, no elektrofiziološka svojstva neurona su izrazito kompleksna i ne koreliraju jasno s klasifikacijom subpopulacija na osnovi molekularnih i aksonskih svojstava. Ipak, podjela GABA-ergičkih neurona na temelju izražavanja određenih molekularnih biljega prikladna je za proučavanje regionalnih i laminarnih razlika u porijeklu i distribuciji različitih populacija kortikalnih GABA-ergičkih neurona (Hladnik i sur., 2014).

#### **1.3.1 Molekularna obilježja i klasifikacija GABA-ergičkih neurona**

Za kortikalne GABA-ergičke neurone karakteristična je visoka razina ekspresije jednog od tri kalcij vežućih proteina (CaBP), parvalbumina (PV), kalbindina (CB) te kalretinina (CR) (slika 1.7). Kako više od 80% kortikalnih GABA-ergičkih neurona pokazuje, bez većeg preklapanja, visok stupanj ekspresije jednog od navedenog kalcij vežućeg proteina, ove su molekule dobar marker za obilježavanje glavnih subpopulacija kortikalnih GABA-ergičkih neurona (Van Brederode i sur., 1990, Kubota i sur., 1994, Kubota i Kawaguchi, 1994, Yan i sur., 1995, Gonchar i Burkhalter, 1997, Tamamaki i sur., 2003,



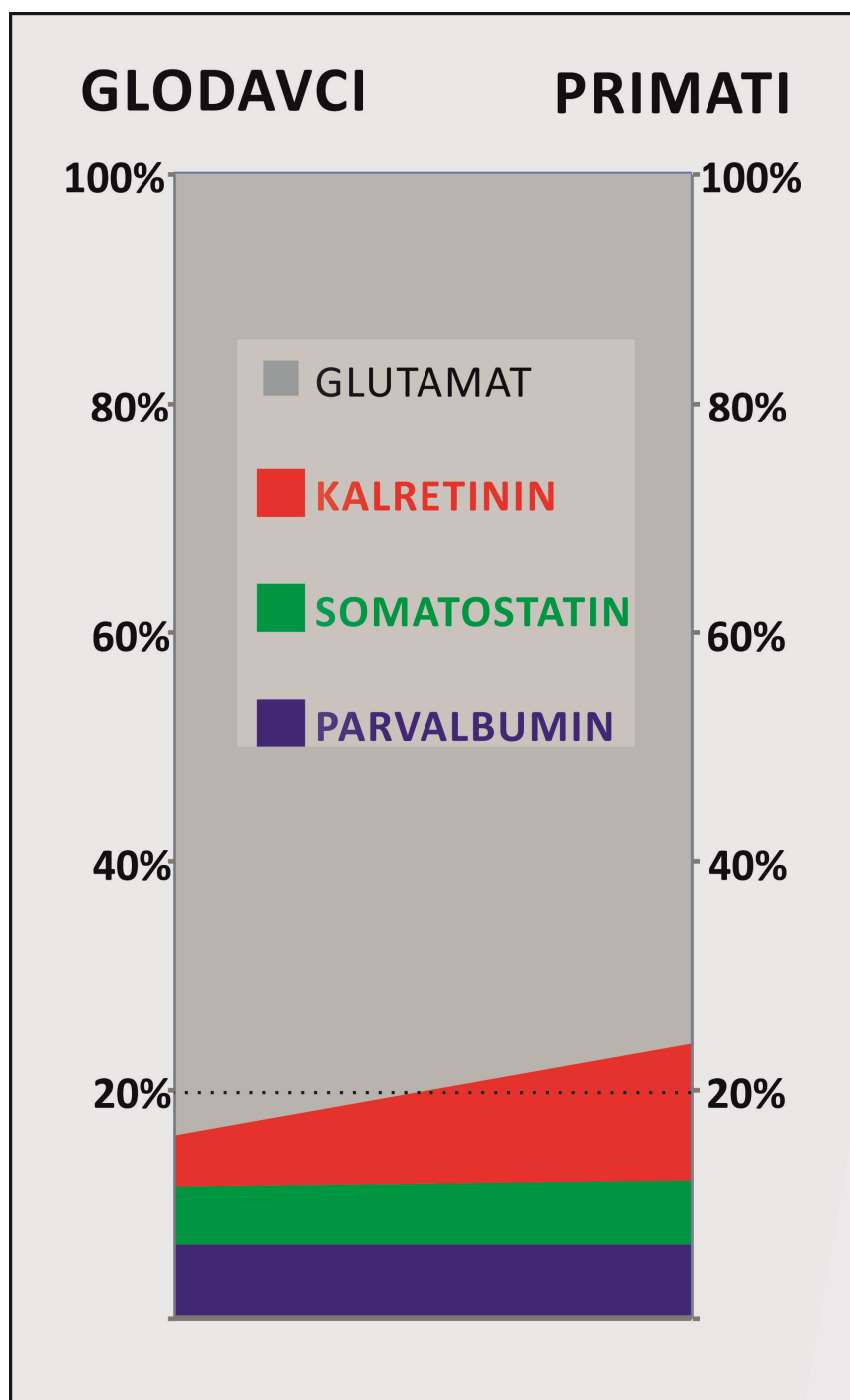
**Slika 1.7** Imunohistokemijski rezovi neokorteksa majmuna obrađeni protutijelima na tri vrste kalcij vežućih proteina.

Ekspresija ovih proteina koristi se za identifikaciju subpopulacija GABA-ergičkih neurona. Iz zbirke majmunskih mozгова dr. Monique Esclapez.

Gonchar i sur., 2007, Burkhalter, 2008, Uematsu i sur., 2008, Xu i sur., 2010). Istraživanja su pokazala da gotovo svi neuroni koji izražavaju kalbindin također izražavaju i neuropeptid somatostatin (Rogers, 1992, Kubota i Kawaguchi, 1994, Gonchar i Burkhalter, 1997, Kawaguchi i Kubota, 1997). No, približno jedna trećina stanica pozitivnih na somatostatin nema prepoznatljivu ekspresiju kalbindina. Somatostatinski neuroni dakle predstavljaju širu populaciju kortikalnih GABA-ergičkih neurona koja uključuje i neurone s visokom razinom sintetaze dušičnog monoksida (nNOS) te neurone pozitivne na neuropeptid Y (NPY), ali negativne na kalbindin. Također, somatostatin se uglavnom ne nalazi u neuronima koji izražavaju parvalbumin ili kalretinin. Stoga je kao biljeg za obilježavanje glavnih subpopulacija GABA-ergičkih neurona, uz parvalbumin i kalretinin bolje koristiti neuropeptid somatostatin jer se na taj način obilježava više od 90% populacije kortikalnih GABA-ergičkih neurona bez značajnijih preklapanja (Hladnik i sur., 2014). Između 5% i 10% ukupne populacije GABA-ergičkih neurona, što odgovara postotku kojega ne obilježava niti jedan od navedena tri glavna biljega, čine neuroni koji izražavaju samo vazoaktivni intestinalni polipeptid (VIP) ili reelin (Burkhalter, 2008, Ma i sur., 2013). Noviji podaci dobiveni na glodavcima pokazali su da populacija neurona koji izražavaju kalretinin, VIP i reelin, izražava i membranski ionotropni receptor za serotonin, 5HT3a. Ova heterogena populacija čini oko 30% svih GABA-ergičkih neurona te zajedno s parvalbuminskom i somatostatinskom populacijom obuhvaća gotovo sve kortikalne GABA-ergičke neurone (Rudy i sur., 2011). Ukoliko bi se to pokazalo primjenjivim na sva kortikalna područja i druge životinjske vrste, svi GABA-ergički neuroni mogli bi se identificirati na temelju ekspresije jedne od tri molekule: 5HT3a receptora, parvalbumina i somatostatina.

### **1.3.2 Porast broja kortikalnih GABA-ergičkih neurona kod primata**

Iako su u različitim vrsta provedene mnogobrojne studije koje su analizirale udio i laminarnu distribuciju kortikalnih GABA-ergičkih neurona (Hendry i sur., 1987, Van Brederode i sur., 1990, Rogers, 1992, Beaulieu, 1993, Kubota i sur., 1994, Micheva i Beaulieu, 1995, Yan i sur., 1995, del Rio i DeFelipe, 1996, Gabbott i Bacon, 1996a, del Rio i DeFelipe, 1997, Gabbott i sur., 1997a, Gabbott i sur., 1997b, Gonchar i Burkhalter, 1997, Tamamaki i sur., 2003, Zaitsev i sur., 2005, Gonchar i sur., 2007, Sherwood i sur., 2007, Tomioka i Rockland, 2007, Uematsu i sur., 2008, Xu i sur., 2010, Barinka i sur., 2012), uslijed različitih metodoloških pristupa teško je uspoređivati dobivene rezultate i stvoriti nedvosmisleni zaključak o postojanju regionalnih i laminarnih razlika unutar jedne vrste ili o razlikama između vrsta. Pokušaj da se stvori jedan opći zaključak o udjelu pojedinih subpopulacija kortikalnih GABA-ergičkih neurona između različitih funkcionalnih područja, ili opći zaključak o tendenciji evolucijskog pomaka između vrsta, predstavljalo bi pretjerano



**Slika 1.8 Udio kortikalnih GABA-ergičkih neurona unutar cjelokupne populacije kortikalnih neurona kod glodavaca i primata.**

Panel prikazuje 50% povećanje udjela kortikalnih GABA-ergičkih neurona između glodavaca i primata. Kod glodavaca je udio kortikalnih GABA-ergičkih približno 16%, a u primata približno 24% od ukupnog broja kortikalnih neurona. Povećanje udjela je najvećim dijelom odraz trostrukog povećanja kalretininske subpopulacije (sa 4% od ukupnog broja kod glodavaca na 12% kod primata). Modificirano prema Hladnik i sur. 2014.

pojednostavljivanje (Burkhalter, 2008). No ipak, rezultati studija koje su analizirale veći broj regija (Tamamaki i sur., 2003, Xu i sur., 2010) ukazuju na visoku konzistenciju u proporciji i laminarnoj distribuciji različitih subpopulacija GABA-ergičkih neurona. Čini se da je čak i glavni obrazac laminarne i regionalne distribucije visoko očuvan kroz evoluciju sisavaca, ali bez proporcionalnog povećanja svih subpopulacija kortikalnih GABA-ergičkih neurona.

Većina studija provedenih na glodavcima pokazuje kako GABA-ergički neuroni predstavljaju manje od 20% svih kortikalnih neurona (Beaulieu, 1993, Micheva i Beaulieu, 1995, Gabbott i sur., 1997a, Tamamaki i sur., 2003). Od tri glavne molekularno definirane populacije, najbrojniju populaciju u glodavaca čine parvalbuminski neuroni s približno 40%, zatim somatostatinski s 30%, dok su kalretininski s približno 25% udjela u populaciji GABA-ergičkih neurona najmalobrojniji (Gonchar i sur., 2007, Uematsu i sur., 2008, Xu i sur., 2010). Za razliku od glodavaca, kod čovjeka kalretininski neuroni postaju najbrojnija populacija te čine gotovo polovicu od ukupnog broja kortikalnih GABA-ergičkih neurona (Conde i sur., 1994, Gabbott i sur., 1997b, Zaitsev i sur., 2005, Barinka i Druga, 2010). Tijekom evolucije dolazi do većeg porasta u broju GABA-ergičkih neurona u odnosu na projekcijske glutamatergične pa tako u primata kortikalni GABA-ergički neuroni čine više od 20% od ukupnog broja svih kortikalnih neurona (Hendry i sur., 1987, del Rio i DeFelipe, 1996, Gabbott i Bacon, 1996b, a, Jones, 2009). Uspoređujući glodavce i primata, udio kortikalnih GABA-ergičkih neurona se kod primata povećava za približno 50% (slika 1.8). Broj parvalbuminskih i somatostatinskih neurona uglavnom raste linearno s povećanjem ukupnog broja kortikalnih neurona te svaka od tih subpopulacija čini između 5-7% i u glodavaca i u primata. Ovo ukazuje kako je porast u proporciji kortikalnih GABA-ergičkih neurona prvenstveno posljedica eksponencijalnog porasta broja kalretininskih neurona čiji udio raste s približno 4% kod glodavaca na približno 12% od ukupnog broja kortikalnih neurona kod primata. Za pretpostaviti je kako ovakav disproportionalan porast jedne od subpopulacija inhibitornih neurona mora dovesti do suštinskih promjena u organizaciji neuralne mreže i načinima procesiranja signala (Burkhalter, 2008). Kako neki istraživači zastupaju mišljenje o dramatičnom povećanju udjela kalretininskih neurona upravo u multimodalnim asocijativnim kortikalnim poljima (Conde i sur., 1994, Gabbott i Bacon, 1996a, Zaitsev i sur., 2005, Barinka i Druga, 2010), koja kod čovjeka predstavljaju gotovo 50% neokortikalne površine, korelacija između porasta proporcije kalretininskih neurona u asocijativnim područjima korteksa čovjeka s izrazitim povećanjem kognitivnih sposobnosti je spekulativna (Forbes i Grafman, 2010), ali očita.



### **1.3.3 Promjene u porijeklu i migraciji kortikalnih GABA-ergičkih neurona kod primata**

Osim promjena u zastupljenosti GABA-ergičkih interneurona, tijekom evolucije dolazi i do promjena u njihovom porijeklu, migraciji, ali i laminarnoj zastupljenosti.

#### **1.3.3.1 Produkcija i migracija GABA-ergičkih neurona tijekom ranog fetalnog razdoblja**

Tijekom kortikogeneze u miša, od E11-E19, gotovo svi kortikalni GABA-ergički neuroni stvaraju se u molekularno i morfološki različitim regijama ventralnog telencefalona (Flames i sur., 2007, Gelman i Marin, 2010) te tangencijalno migriraju u moždanu koru (Van Eden i sur., 1989, Parnavelas i sur., 2002, Faux i sur., 2010, Hernandez-Miranda i sur., 2010, Antypa i sur., 2011). Glavni izvor ovih neurona je medijalni ganglijski brežuljak (MGE) u kojem se stvara približno 50–60% kortikalnih GABA-ergičkih neurona čija proliferacija doseže vrhunac oko E12–E13 (Wichterle i sur., 2001, Wonders i Anderson, 2006, Butt i sur., 2007, Gelman i Marin, 2010). MGE je definiran ekspresijom homeobox transkripcijskog faktora Nkx2.1 (Sussel i sur., 1999, Butt i sur., 2008). Parvalbuminska subpopulacija potječe od Nkx2.1 progenitora iz ventralnog dijela MGE, dok Nkx6.2 koekspimirajući progenitori iz dorzalnog dijela MGE stvaraju somatostatinsku subpopulaciju kortikalnih GABA-ergičkih neurona (Flames i sur., 2007, Fogarty i sur., 2007, Wonders i sur., 2008). Nakon što napuste MGE, migratorni kortikalni GABA-ergički neuroni smanje ekspresiju Nkx2.1, ali zadržavaju Sox6 ekspresiju nužnu za njihovo pravilno pozicioniranje i sazrijevanje (Batista-Brito i sur., 2009).

Drugi najveći izvor kortikalnih GABA-ergičkih neurona je kaudalni ganglijski brežuljak (CGE). Ovdje se stvara oko 30% svih kortikalnih GABA-ergičkih neurona čija proliferacija doseže vrhunac kasnije, oko E16.5 (Miyoshi i sur., 2010). Progenitori iz CGE ekspimiraju transkripcijski faktor COUP-TFI/II (Kanatani i sur., 2008) i stvaraju različite vrste kortikalnih GABA-ergičkih neurona koji se pretežito smještaju u površnije slojeve (Miyoshi i sur., 2010). Interneuroni iz CGE obuhvaćaju dvije velike grupe: bipolarne interneurone koji ekspimiraju kalretinin i/ili vazoaktivni intestinalni peptid (Xu i sur., 2004, Butt i sur., 2005, Wonders i Anderson, 2006), kao i neuroglijaformne reelin pozitivne stanice (Miyoshi i sur., 2010). Treba spomenuti kako COUP-TFI/II nije biljeg koji selektivno označava CGE, već je u tom dijelu intenzivno izražen u stanicama.

Treći izvor, koji daje oko 10% GABA-ergičkih neurona u mišjoj moždanoj kori, je preoptičko područje (POA). Različiti progenitori unutar preoptičkog područja koji izražavaju Nkx5.1 i Dbx1, stvaraju vrlo raznolike vrste kortikalnih GABA-ergičkih neurona (Gelman i Marin, 2010).



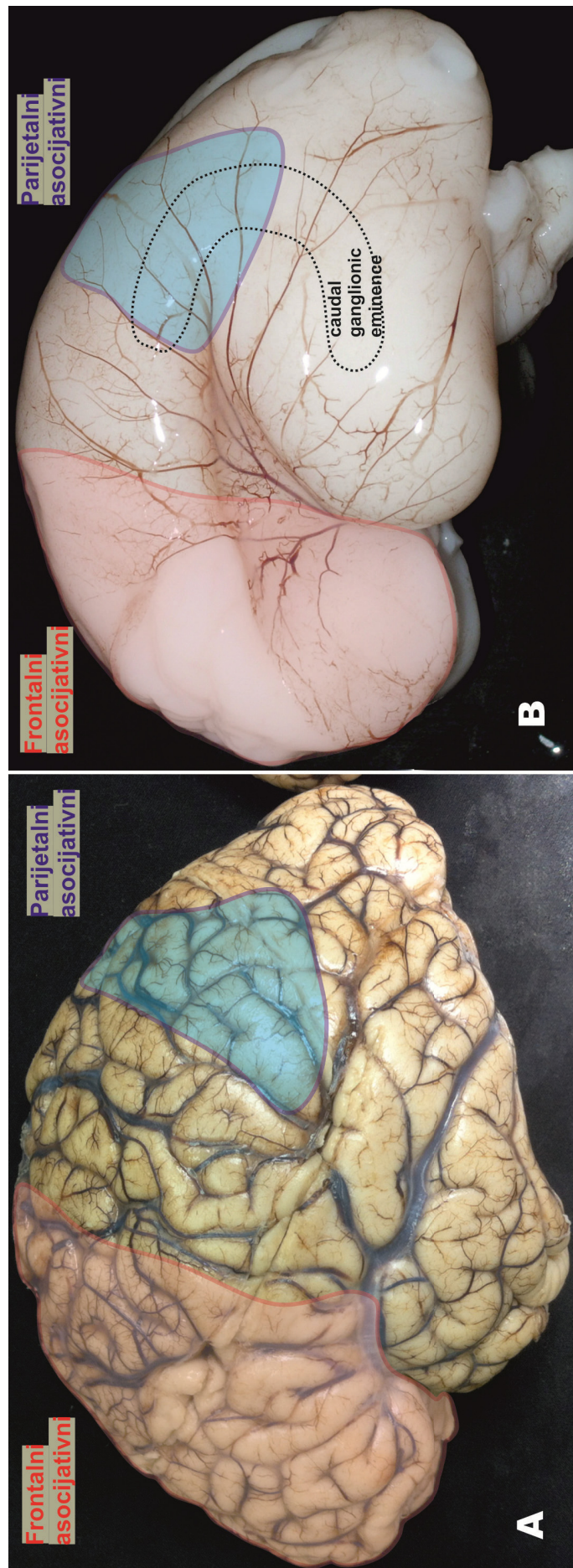
Preostali veliki dio ventralnog telencefalona, lateralni ganglijski brežuljak (LGE), izvor je projekcijskih GABA-ergičkih neurona strijatuma te interneurona za olfaktorni bulbus i amigdala (Corbin i sur., 2008). LGE služi kao migratorni put za interneurone iz susjednog MGE (Wichterle i sur., 2001) i manjim dijelom iz CGE (Miyoshi i sur., 2010). Za razliku od većeg dijela LGE, dorzalni dio (dLGE) koji je smješten blizu proliferativnih zona dorzalnog telencefalona, karakteriziran je jakom ekspresijom zinc finger transkripcijskog faktora Sp8 i kod miša stvara kalretininske neurone za olfaktorni bulbus i amigdala, a samo manjim dijelom kalretininske neurone neokorteksa. No kod ljudi ljudi, uslijed smanjene potrebe za neuronima olfaktornog bulbusa, Sp8 progenitori iz dLGE u značajnijoj mjeri pridonose stvaranju kalretinskih GABA-ergičkih neurona (Ma i sur., 2013).

Novija istraživanja provedena na primatima ukazala su na očuvan obrazac ekspresije transkripcijskih faktora u subpalijumu fetusa majmuna i čovjeka (Hansen i sur., 2010, Ma i sur., 2013, Pauly i sur., 2013). Također, očuvan je i obrazac porijekla glavnih subpopulacija kortikalnih GABA-ergičkih neurona iz subpalijuma. Sox6 eksprimirajući progenitori iz MGE stvaraju somatostatinsku i parvalbuminsku subpopulaciju, dok COUP-TFII i/ili Sp8 eksprimirajuće stanice iz CGE i dLGE pridonose kalretininskoj subpopulaciji (Ma i sur., 2013). Tako se kod primata tijekom ranog fetalnog razdoblja (E47-E55 kod majmuna i 8-13PCW kod čovjeka) kortikalni GABA-ergički neuroni većinom stvaraju u ganglijskom brežuljku (Letinic i sur., 2002). Kasnije tijekom razvoja, proliferativne zone primata pokazuju nova organizacijska obilježja koja nemaju jasne sličnosti s glodavcima. To i nije iznenađujuće jer laminarna i stanična organizacija razvojnih zona telencefalona tijekom ranog fetalnog razdoblja kod primata ima obilježja koja odgovaraju onima kod glodavaca tijekom cjelokupnog razdoblja neurogeneze (Rakic, 2009). Kod majmuna i čovjeka, čak i tijekom ranog fetalnog razdoblja, primijećeno je dramatično povećanje populacije progenitora u ganglijskom brežuljku uz pojavu specifičnih morfoloških obilježja, što ukazuje na značajne razlike u organizaciji razvoja telencefalona kod primata već i u najranijim razdobljima embrionanog razvoja (Hansen i sur., 2013).

### 1.3.3.2 Produkcija i migracija GABA-ergičkih neurona tijekom srednjeg i kasnog fetalnog razdoblja

Iako se u primata većina kortikalnih GABA-ergičkih neurona tijekom ranog fetalnog razdoblja stvara u području ganglijskog brežuljka (ventralna subventrikularna zona), značajno veći broj kortikalnih neurona stvara se nakon ranog fetalnog razdoblja, kada neurogeneza doseže svoj vrhunac (Rakic, 2002). Novija istraživanja su pokazala da se tijekom drugog tromjesečja gestacije kod primata (E64–E75 kod majmuna i 15–24PCW kod čovjeka) određeni postotak kortikalnih GABA-ergičkih neurona stvara i u kortikalnim proliferativnim zonama (Letinic i sur., 2002, Rakic i Zecevic, 2003b, Petanjek i sur., 2009a, Yu i Zecevic, 2011, Zecevic i sur., 2011). Glavni izvor palijalnih kortikalnih GABA-ergičkih neurona kod primata postaje vanjska subventrikularna zona koja ne postoji u miša. Podaci dobiveni iz studija na glodavcima pokazuju da dorzalne proliferativne zone ne pridonose ili pridonose stvaranju iznimno malog broja kortikalnih GABA-ergičkih neurona kod glodavaca (Xu i sur., 2004, Molnar i sur., 2006, Wonders i Anderson, 2006).

Koristeći se metodom retrovirusa, u organotipskim kulturama fetalnog ljudskog mozga Letinić i suradnici (Letinic i sur., 2002) pokazali su postojanje dviju različitih linija kortikalnih GABA-ergičkih neurona. Linija koja je izražavala *Dlx1/2* potjecala je iz ganglijskog brežuljka i predstavlja 35% kortikalnih GABA-ergičkih neurona. Preostali veći dio činila je linija koja je izražavala *Dlx1/2* i *Mash1* te potjecala iz neokortikalne ventrikularne/subventrikularne zone, ali tek nakon 15. tjedna nakon začeća. Dominantno stvaranje kortikalnih GABA-ergičkih neurona u palijalnim proliferativnim zonama u čovjeka tumačilo se kao evolucijski odgovor na eksponencijalno povećanje veličine telencefalona. Naime, ukoliko bi se stvarali samo u ganglijskom brežuljku, tijekom srednjeg tromjesečja trudnoće svi kortikalni GABA-ergički neuroni morali bi zbog povećanja volumena telencefalona migrirati nekoliko tjedana i to kroz gustu mrežu urastajućih aksona (Tan, 2002, Molnar i sur., 2006). Stoga bi se masovnom produkcijom GABA-ergičkih neurona u proliferativnim zonama palijuma put migracije značajno skratio i pojednostavnio, jer bi se oni stvarali i lokalno, blizu područja u koje će se smjestiti. Očekivalo se da se, paralelno s povećanjem proliferacije u palijumu, migracija iz ventralnih, subpalijalnih proliferativnih zona u kasnijim fetalnim razdobljima značajno smanjuje. To se, međutim, ne događa (Petanjek i sur., 2008), a uz to je ganglijski brežuljak kao proliferativna struktura u ljudskih fetusa očuvan do posljednjeg tromjesečja trudnoće (Letinic i Kostović, 1997, Petanjek i sur., 2008, Petanjek i sur., 2009b, Hladnik i sur., 2014, Arshad i sur., 2016) te se produkcija kortikalnih GABA-ergičkih neurona nastavlja i u tom razdoblju (Hladnik i sur., 2014, Arshad i sur., 2016). Ovi podaci ukazuju da palijalna produkcija nije mehanizam kojim se olakšava put migracije, već najvjerojatnije predstavlja novi spremnik progenitora koji stvaraju specifične vrste kortikalnih GABA-ergičkih neurona.



**Slika 1.9 Odrasli i fetalni ljudski mozak s označenim multimodalnim asocijativnim područjima.**

Slika A prikazuje da multimodalna asocijativna područja zauzimaju 80% frontalnog režnja (crveno) te većinu parijetalnog i rubne dijelove temporalnog i okcipitalnog režnja (plavo). U ovim područjima kalretinski neuroni čine gotovo polovicu GABA-ergičke populacije i više od 10% ukupnog broja neurona. Slika B prikazuje da već tijekom midgestacije proporcije ovog područja odgovaraju onima u odrasloj dobi te udaljenost kaudalnog ganglijskog brežuljka (CGE) od područja u kojima se nalazi najveći broj kalretinskih neurona. Konture položaja CGE prikazane su isprekidanom crtom. Preuzeto iz Hladnik i sur. 2014.

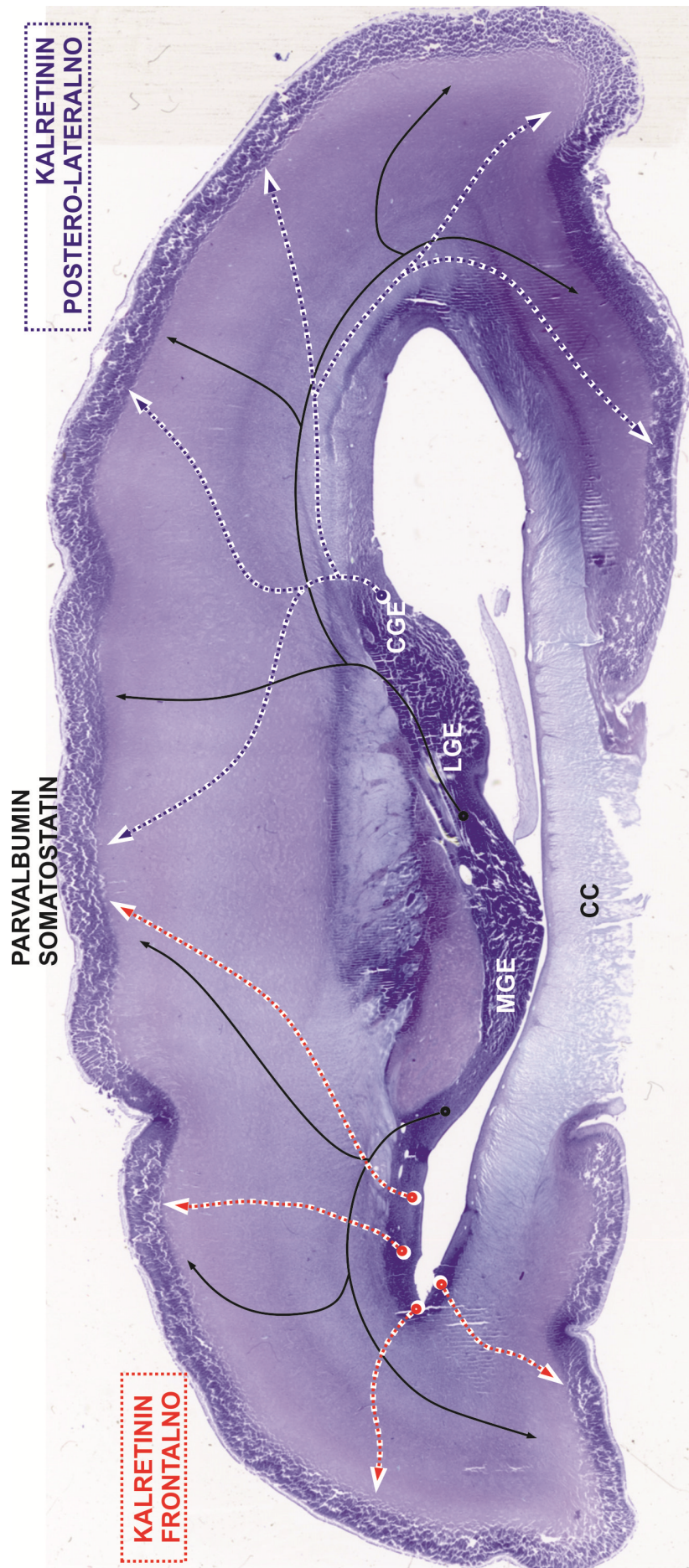
Kako su kod holoprozencefalije, malformacije obilježene hipoplazijom strijatuma i atrofijom ganglijskog brežuljka, očuvani kalretininski neuroni, a broj ostalih subpopulacija GABA-ergičkih neurona značajno se smanjio (Fertuzinhos i sur., 2009), može se zaključiti da palijalni GABA-ergički progenitori uglavnom stvaraju kalretininsku subpopulaciju. Ovakvo tumačenje ima uporište i u činjenici da kalretininski neuroni postaju kod primata daleko najbrojnija subpopulacija te ih je gotovo 80% smješteno slojevima I-III (Džaja, 2015). Kako se kod primata u ovim slojevima povećava i udio projekcijskih neurona, čemu posebno pridonosi vanjski, novi dio subentrikularne zone, lako je moguće da ona postaje i novi spremnik GABA-ergičkih progenitora (Rakic, 2009). U prilog tome je i podatak da mnogi kasnije stvoreni interneuroni pripadaju kalretininskim koji uključuju bipolarno razgranate (engl. *double bouquet*) stanice zastupljene samo u površnijim slojevima ljudskog neokorteksa (Jakovcevski i sur., 2010, Defelipe, 2011). Također, *in vitro* istraživanja pokazuju kako ljudske, ali ne i mišje Nkx2.1 ekspimirajuće radijalne glija stanice, imaju potencijal stvarati kalretininske interneurone (Yu i Zecevic, 2011).

Međutim, obilježavajući novostvorene neurone u kulturama stanica i mapirajući proliferirajuće progenitore interneurona te proučavajući obrazac ekspresije nekoliko transkripcijskih faktora u telencefalonu majmuna i čovjeka, Hansen i suradnici (2013) te Ma i suradnici (2013) nisu mogli pokazati značajniju palijalnu produkciju te su predložili da u primata većina kortikalnih GABA-ergičkih neurona potječe iz ganglijskog brežuljka. S druge strane, Al-Jaberi i suradnici (2013) pokazali su kako ljudske kortikalne progenitorne stanice frontalnog režnja imaju kapacitet stvarati inhibitorne interneurone. Iako kod primata produžena proliferacija u ganglijskom brežuljku tijekom drugog tromjesečja trudnoće i povećana zaliha kalretininskih progenitora u CGE može objasniti povećanje udjela kalretininskih neurona, malo je vjerojatno da ganglijski brežuljak može biti dovoljan za opskrbu frontalnog korteksa kalretininskim neuronima (Hladnik i sur., 2014). U područjima s velikom zastupljenošću kortiko-kortikalnih neurona, kao što su viša asocijativna područja frontalnog i parijetalnog korteksa (slika 1.9) (Uylings i van Eden, 1990, Groenewegen i Uylings, 2000, Uylings i sur., 2003, Rakic, 2009, Petanjek i sur., 2011, Semendeferi i sur., 2011), kalretininski neuroni čine blizu polovice cijele kortikalne GABA-ergičke populacije (Gabbott i sur., 1997b, Džaja i sur., 2014, Džaja, 2015). S obzirom na njihovo peterostruko povećanje udjela kod primata u odnosu na glodavce (Džaja i sur., 2014, Džaja, 2015), CGE i s povećanom zalihom progenitora i produženom neurogenezom nije u mogućnosti stvoriti dovoljno količinu kalretininskih neurona. Također, viša asocijativna područja frontalnog režnja, u kojima je smješteno između trećine i polovice ukupnog broja kalretininskih neurona neokorteksa, potpuno su udaljeni od CGE (slika 1.9), što upućuje na zaključak da se produkcija za ta područja ipak odvija u bližim strukturama. Kod primata, dLGE kao rostralna ekstenzija CGE daje kod primata prvenstveno neurone za koru mozga, a ne olfaktorni

bulbus, kao što je slučaj kod glodavaca. Kako se dLGE nalazi bliže frontalnom režnju, ovo bi područje moglo stvarati primarno kalretininske neurone za frontalni korteks. Uzimajući u obzir količinu progenitora u dLGE i potrebe za kalretininskim neuronima u frontalnom korteksu, teško je za pretpostaviti da je dLGE glavni izvor kortikalnih neurona za frontalno područje (Hladnik i sur., 2014).

U nedavnom radu (Hladnik i sur., 2014) predložili smo da se proturječni podaci dobiveni iz nedavnih istraživanja o porijeklu kortikalnih GABA-ergičkih neurona u primata, oni koji upućuju na masivnu palijalnu produkciju kortikalnih GABA-ergičkih neurona (Letinic i sur., 2002, Rakic i Zecevic, 2003b, Zecevic i sur., 2005, Mo, 2007, Fertuzinhos i sur., 2009, Petanjek i sur., 2009a, Zecevic i sur., 2011, Al-Jaberi i sur., 2013) i oni koji govore o neznatnoj dorzalnoj produkciji (Hansen i sur., 2013, Ma i sur., 2013), mogu objasniti regionalnim razlikama ili varijacijama u porijeklu kalretininskih neurona. Smatramo da je kod primata CGE glavni izvor kalretininskih neurona za posteriorne i lateralne dijelove moždane kore, dok se frontalni režanj opskrbljuje većinom iz dorzalnih proliferativnih zona (slika 1.10).





**Slika 1.10** Porijeklo glavnih subpopulacija GABA-ergičkih neurona kod čovjeka.

Slika prikazuje horizontalni rez kroz tijelo korpus kalozuma (CC) pri kraju srednje trećine trudnoće obojen Nissl metodom. Tijekom prvog tromjesečja, parvalbuminski i somatostatinski GABA-ergički neuroni se stvaraju u medijalnom ganglijskom brežuljku (MGE), dok se u kaudalnom ganglijskom brežuljku (CGE) stvaraju kalretininski neuroni. U lateralnom ganglijskom brežuljku stvaraju se GABA-ergički neuroni većinom za subkortikalne strukture. Tijekom srednjeg tromjesečja trudnoće, CGE ostaje glavni izvor kalretininskih neurona za parijetalni, okcipitalni i temporalni režanj (postero-lateralni telencefalon) dok u frontalni režanj dolaze kalretininski neuroni iz kortikalne proliferativne zone.

Modificirano prema Hladnik i sur 2014.



## **2. HIPOTEZA**

U formiranju ranih funkcionalnih krugova telencefalona sudjeluje veći broj GABA-ergičkih i ne-GABA-ergičkih neuronskih populacija koje se stvaraju u udaljenim proliferativnim područjima. Ove populacije razlikuju se po molekularnim obilježjima i do svojeg konačnog odredišta tangencijalno migriraju različitim putevima kroz subventrikularnu i intermedijalnu zonu, odnosno kroz marginalnu zonu.

## **3. CILJEVI RADA**

### **3.1 Opći cilj**

Opći cilj istraživanja je opisati promjene morfoloških i kemijskih obilježja tangencijalno migrirajućih stanica telencefalona te promjene njihove distribucije u majmuna i čovjeka tijekom prve polovice trudnoće, s posebnim osvrtom na medijalni zid.

### **3.2 Specifični ciljevi**

Specifični ciljevi su:

- 1) analizirati promjene distribucije tangencijalno migrirajućih stanica na Golgi impregniranim rezovima,
- 2) analizirati laminarne promjene u zonama stvaranja i putevima tangencijalne migracije na rezovima obojenim Nissl metodom,
- 3) analizirati morfologiju i distribuciju stanica koje izražavaju GAD65 i GAD67 te stanica koje izražavaju jedan od neuropeptida i kalcij vežućih proteina prisutnih u glavnim subpopulacijama GABA-ergičkih neurona (somatostatin, kalbindin, kalretinin i parvalbumin) primjenom imunohistokemijskih metoda,
- 4) analizirati svojstva proliferativnih zona temeljem imunohistokemijske analize distribucije biljega proliferativnih stanica (Ki67, Mash1, PCNA).





#### 4. MATERIJALI I METODE

U ovom radu mikroskopski su analizirani rezovi postmortalnog ljudskog i majmunskog fetalnog tkiva mozga obrađeni imunohistokemijskim i klasičnim neurohistološkim metodama. Ljudsko tkivo dio je Zagrebačke neuroembriološke zbirke, Hrvatski institut za istraživanje mozga, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu (Kostović i sur., 1991, Judaš i sur., 2011). Tkivo cynomologus majmuna dio je kolekcije dr. Monique Esclapez (uključuje tkivo i histološki obrađen materijal dr. Brigitte Berger) Institute de Neurosciences des Systemes (INS-INSERM UMR1106) Medicinski fakultet LaTimone, Aix en Provance University, Marseille, Francuska (Berger i sur., 1993, Berger i Alvarez, 1996) U ovom istraživanju analiziran je dio arhivskog obrađenog histološkog materijala, a dodatno je imunohistokemijski obrađeno više od 200 rezova dobivenih od smrznutih blokova moždanog tkiva. Svi eksperimentalni postupci su u skladu s protokolima odobrenima od strane Savjeta Europske zajednice (European Communities Council 86/609/EEC), Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Zagrebu, Sveučilišta Aix-Marseille te Odbora za istraživanje na životinjama francuskog Državnog primatološkog centra (Ethical Committee of the INRA Primate Center).

## 4.1 UZORAK

### 4.1.1 Ljudsko tkivo

U ovom radu sustavno je analizirano 8 serijski izrezanih mozгова ljudskih fetusa u dobi između 6. i 17. tjedna nakon začeća (engl. *postconceptional week*, PCW) (tablica 4.1) koji su dio Zagrebačke neuroembriološke zbirke (Kostović i sur., 1991, Judaš i sur., 2011). Dodatno su analizirani izabrani rezovi u 17 fetusa, novorođenčeta i djeteta starosti 18 mjeseci (tablica 4.1). Dob embrija i fetusa je procijenjena na temelju duljine tjeme-zadak (CRL engl. *crown rump length*) (Olivier i Pineau, 1961), kliničkih podataka o trajanju amenoreje i makroskopskih obilježja mozga (Kostović, 1990), a izražena je u tjednima nakon začeća (engl. *postconceptional week*, PCW). Materijal je dobiven tijekom redovitih obdukcija nakon spontanij ili medicinski opravdanih pobačaja prema hrvatskim zakonskim propisima i uz dozvolu Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Analizirani su samo uzorci uzeti iz mozgov bez vidljivih neuropatoloških promjena.

**Tablica 4.1** Popis uzoraka analiziranog postmortalnog ljudskog fetalnog tkiva mozga

oznaka	CRL (mm)	dob (PCW)	Nissl	Golgi	NeuN	MAP2	MAP1b (MAP5)	SMI312	SMI81 (SNAP25)	CR	AChE
ČF41	25	6,5	+								
ČF96	43	9	+								
ČF59	60	10	+	+							
ČF95		11	+								
ČF127	75	11	+								+
ČF66	83	12	+								
ČF10	85	13	+	+							
ČF17	100	13		+							
Yale83		14	+								
ČF134	120	15	+								
ČF290, ČF223	153	17	+	+							
ČF288		24		+							
ČF551		35				+					
h20		17	+								+
h19		8,5	+								
h3		13	+								
h4		10	+								
ČF87, ČF479		20	+								
ČF471, ČF475, ČF478		20/21			+	+	+	+	+	+	
ČF362		28									+
ČF517		30						+			
ČF528		novoro đenče	+					+			
ČD33		18 mj	+								

#### 4.1.2 Majmunsko tkivo

U ovom radu analizirano je 13 fetalnih mozgova cynomologus majmuna (*Macaca fascicularis*) embrionalne dobi (E, dan nakon začeća, engl. *embryonic day*) od E46 do E109 (tablica 4.2) koji su dio kolekcije dr. Monique Esclapez (Berger i sur., 1993, Berger i Alvarez, 1996). Majmuni korišteni u ovom istraživanju uzgojeni su za znanstvena istraživanja u kontroliranim i standardiziranim uvjetima Odjela za primatologiju Državnog centra za znanstvena istraživanja, Francuska (Station de Primatology Centre National de la Recherche Scientific). Za svaku životinju postoji pojedinačna evidencija o povijesti uzgoja te zdravstvenom stanju. Svi postupci nad životinjama izvedeni su u općoj anesteziji. Materijal je prikupljen nakon carskih rezova uz dozvolu Ethical Committee of the INRA Primate Center i European Communities Council Directive. Na analiziranom moždanom tkivu nisu uočene morfološke ili histološke abnormalnosti.

**Tablica 4.2** Popis uzoraka analiziranog postmortalnog majmunskog fetalnog tkiva mozga

oznaka	dob (E)	Nissl	NeuN	Mash1	Ki67	PCNA	GAD65	GAD67	GABA	CR	CB	PV	SOM	AChE
mE46	46	+								+	+	+		
mE48	48	+		+			+	+		+	+		+	
mE55ME	52	+		+	+		+	+					+	
mE56BB	56	+							+	+	+	+		
mE64BB mE64ME	64	+		+			+	+			+		+	
mE68ME mE68BB	68	+		+			+	+		+	+		+	
mE70BB	70	+												
mE75ME	75	+	+	+	+	+	+	+					+	
mE83	83		+							+	+		+	+
mE90	90	+								+				
mE109	109			+					+					

## 4.2 METODE

Majmuni su duboko anestezirani ketaminom-HCl, nakon čega su perfundirani intrakardijalno hladnom otopinom 4% formaldehida u 0,12 molarnom puferu natrijevog fosfata. Mozak je odstranjen te je narezan u koronalnoj ravnini.

Blokovi tkiva za imunohistokemijsku analizu su nakon fiksacije i ispiranja ostavljeni preko noći na 4°C, krioprotektirani u otopini 20% saharoze u fosfatnom puferu. Nakon toga tkivo je brzo smrznuto pomoću suhog leda te koronalno izrezano na kriostatu. Debljina rezova bila je od 40µm do 150µm. Nakon ispiranja u 0.01 molarnoj puferiranoj otopini fosfatnih soli, rezovi su prikupljani jedan za drugim u za to priređene posudice sa krioprotekcijskom otopinom na bazi etilen-glikola i pohranjeni na -20°C do daljnje histološke obrade. Prije uporabe, otopina fosfatnog pufera i krioprotekcijska otopina su tretirane s 0,05% dietilpirokarbonatom te autoklavirane kako bi se inaktivirala aktivnost RNaza. Moždano tkivo je u pojedinim primjercima obrađeno i klasičnim neurohistološkim metodama.

### 4.2.1 Klasične neurohistološke metode

Tri temeljne neurohistološke metode kojima se prikazuje stvarni izgled neurona, opći plan staničnog ustrojstva sive tvari te opći plan građe bijele tvari uveli su krajem 19. stoljeća Camillo Golgi, Franz Nissl i Carl Weigert (Kandel i sur., 2013). Metodu koja omogućava analizu cjelokupne morfologije pojedinačnog neurona otkrio je Camilo Golgi, a najveći doprinos u istraživanjima tom metodom pružio je Santiago Ramon y Cajal (DeFelipe i Jones, 1988). Golgi metoda se temelji na impregnaciji neurona srebrnim solima, gdje se prilikom uspješne impregnacije boji 1-4% (najviše do 10%) neurona. Zbog impregniranja samo manjeg postotka neurona omogućena je analiza cjelokupne morfologije pojedinačnog neurona. Osnovna poteškoća metode je da uspijeva samo kada je kratko postmortalno vrijeme, bez preagonalnog stanja kao i da su pored toga rezultati uspješnosti impregnacije vrlo varijabilni (Williams i sur., 1978). Nisslovom metodom prikazuju se samo tijela i početni dijelovi aksona i dendrita te ona omogućava prikaz citoarhitektonike različitih moždanih područja. U ovom istraživanju korištene su ove dvije spomenute neurohistološke metode.

#### 4.2.1.1 Golgi metoda

Fetalni ljudski mozgovi impregnirani su modifikacijom Del Rio Hortega Golgi metode prema Stensaasu (Stensaas, 1967) koja se pokazala najboljom metodom za prikaz stvarnog izgleda neurona u ranom fetalnom razdoblju (Mrzljak i sur., 1988). Nakon vađenja mozga iz lubanje blokovi debljine 3-5 mm pohranjeni su na tamno mjesto u fiksativu na 48-72 sata, uz

izmjenu svježeg fiksativa odmah nakon jednog sata i zatim ponovno nakon 24 sata. Golgi Stensaas fiksativ sadrži sljedeće sastojke:

destilirana voda	100 ml H <sub>2</sub> O
kalijev bikromat	5 g K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>
koncetrirani formalin (35%)	10 ml
glutaraldehid (25%)	10 ml
kloral hidrat	5 g
dimetilsulfoksid	5 kapi

Slijedi tretiranje blokova 1.5% otopinom srebrnog nitrata (AgNO<sub>3</sub>), koja se zamijeni nakon 24 sata. U promijenjenoj otopini srebrnog nitrata blokovi ostaju daljnjih 2-4 dana. Nakon toga slijedi dehidracija i uklapanje u celuidin. Blokovi se zatim rutinski dehidriraju te preko noći ostavljaju u 2% cedukolu, a drugi dan u 4% cedukol. Smjesa kloroforma i alkohola prelije se u petrijeve posudice po površini stvrdnutog cedukola. Blokovi se odmah zatim režu mikrotomom u rezove debljine 120-200µm. Rezovi se prikupljaju u 70% alkohol, dehidriraju te se pokriju Histamountom.

#### 4.2.1.2 Nissl metoda

Radi utvrđivanja položaja neurona u određenim fetalnim zonama, susjedni rezovi majmunskog moždanog tkiva debljine 30-60µm rutinski su obojeni metodom po Nisslu. Analizirani su i serijski izrezani ljudski mozgovi odgovarajućeg stadija obojeni metodom po Nisslu.

Rezovi majmunskog moždanog tkiva prvo su dva puta po 10 minuta uronjeni u 95% alkohol, nakon čega su na 15 minuta uronjeni u otopinu kloroform-etera, a zatim ponovno obrađeni u alkoholu s padajućim postotkom etanola (95%, 85%, 75%; svaka izmjena po dvije minute). Nakon kratkog ispiranja u dvostruko destiliranoj vodi, rezovi su na 10 minuta stavljeni u krezil-violet na temperaturi 60°C. Nakon drugog kratkog ispiranja u dvostruko destiliranoj vodi, rezovi su (za svaku otopinu po 2 minute) uronjeni u seriju alkohola s povećavajućom koncentracijom etanola (80%, dva puta u 90%, dva puta u 100%). Zatim su tri puta po dvije minute uronjeni u Histamount te nakon toga prekriveni Eukitom i pokrovnim stakalcem.

#### 4.2.2 Imunohistokemijske metode

U ovom istraživanju analiziran je dio arhivskog histološkog materijala iz Zagrebačke neuroembriološke zbirke obrađen AchE-histokemijskom metodom i imunohistokemijskim metodama za otkrivanje biljega neurona (SMI 312, SMI 81, MAP1b, MAP2, NeuN) koje su detaljno opisane u radu (Kostović i sur., 2004).

Za otkrivanje različitih biljega na razini proteina korištene su imunohistokemijske metode. Eksperimentalni postupak odrađen je u laboratoriju dr. Monique Esclapez prema protokolima opisanima u radovima (Berger i sur., 1999, Berger i sur., 2001, Dinocourt i sur., 2003, Petanjek i sur., 2009a). Imunohistokemijske metode uključivale su otkrivanje sljedećih molekula (tablica 4.3 i tablica 4.4): izoforme glutamat–dekarboksilaze (GAD65 i GAD67, sintetizirajuće enzime za GABA), neuropeptida i kalcijum vežućih proteina izraženih u različitim populacijama interneurona (somatostatin, kalbindin, kalretinin, parvalbumin), biljega proliferativnih stanica (Ki67, PCNA) i progenitora telencefaličkih GABA-ergičkih neurona (Mash1), biljega postmigratornih neurona (NeuN) te biljega kolinergičkih neurona (AchE).

Svaki deseti rez obojen je Nissl metodom, a susjedni rezovi obrađeni su 1) jednostrukim imunohistokemijskim bojenjem za analizu ekspresije GAD65, GAD67, Mash1, Ki67, PCNA, AchE te kalbindina, kalretinina, parvalbumina i somatostatina; 2) dvostruko imunohistokemijsko bojenje za analizu ekspresije GAD65 i Mash1, GAD67 i Mash1, GAD67 i NeuN, somatostatin i NeuN.

Slobodno plivajući rezovi za jednostruko i dvostruko imunohistokemijsko bojenje ispirani su kroz 30 min u 0.02 molarnoj otopini kalijevog fosfatnog pufera (KPBS; 16mM  $K_2HPO_4$ , 3.5mM  $KH_2PO_4$ , 150mM NaCl, pH 7.4) te inkubirani u 1% hidrogen peroksidu kroz 30 min da bi se blokirala endogena peroksidaza i isprani u KPBS.

**Tablica 4.3** Protutijela korištena u imunohistokemijskim bojenjima

<i><b>monoklonalna protutijela</b></i>				
<b>biljeg</b>	<b>razrjeđenje</b>	<b>proizvođač</b>	<b>vrsta</b>	<b>referenca</b>
GAD67	1:4000	Chemicon	miš	kataloški broj MAB5406
GAD65 (GAD-6)	1:100	Chemicon	miš	Petanjek i sur. 2009; Berger 2001
Mash1	1:200	dr. Jane Jonhson	miš	Petanjek i sur. 2009
Ki67 (klon SP6)	1:100	Vector Lab	zec	Petanjek i sur. 2009
parvalbumin	1:4000	Swant	miš	Berger i sur. 1999; Dinocourt 2003
parvalbumin	1:6000	Sigma	miš	Berger i sur. 1999; Berger i Alvarez 1996
kalretinin	1:4000	Swant	miš	kataloški broj 6B3
kalbindin	1:180000- 200000	dr. W. Hunziker	miš	Berger i Alvarez 1996
kalbindin	1:5000	Swant	miš	Berger i Alvarez 1996; Dinocourt 2003
NeuN	1:1000	Chemicon	miš	Kostović; Dinocourt 2003
MAP2	1:500	Sigma	miš	Kostović i sur. 2005
MAP1b (MAP5)	1:1000	Sigma	miš	Kostović i sur. 2005
SMI81 (antiSNAP25)	1:1000	Sternberger Monoclonals	miš	Kostović i sur. 2005
SMI312	1:500-1000	Sternberger Monoclonals	miš	Kostović i sur. 2005
AchE	1:250-1000	Chemicon	miš	Berger i sur. 2001
<i><b>poliklonalna protutijela</b></i>				
<b>biljeg</b>	<b>razrjeđenje</b>	<b>proizvođač</b>	<b>vrsta</b>	<b>referenca</b>
GAD67 (K2 antiserum)	1:4000	Chemicon	zec	Petanjek i sur. 2009; Berger i sur. 2001
somatostatin	1:4000	Peninsula	zec	Dinocourt 2003
kalretinin	1:10000	Swant	zec	Berger i sur. 2001; Berger i Alvarez 1996
kalbindin	1:60000- 80000	dr. D.E.M. Lawson	zec	Berger i Alvarez 1996
kalbindin	1:70000- 80000	Swant	zec	Berger i Alvarez 1996
GABA	1:100	Sigma	zec	Berger i sur. 2001



#### 4.2.2.1 Jednostruko imunohistokemijsko bojenje

Jednostruko bojenje izvršeno je s neoznačenim primarnim protutijelom te standardnom metodom kompleksa avidin-biotin-peroksidaza (ABC) (Vectastatin Elite ABC, Vector Laboratories, Burlingame, CA) i streptavidin-biotin-peroksidaza (Amersham, Little Chalfont, UK).

Rezovi su inkubirani tijekom jednog sata u otopini kalijevog fosfatnog pufera (KPBS) s Tritonom i 3% normalnim kozjim ili konjskim serumom (Vector Laboratories) te preko noći u KPBS s odgovarajućim razrijeđenim primarnim monoklonalnim ili poliklonalnim protutijelom (tablica 4.3 i tablica 4.4) uz 1% normalnog kozjeg (za poliklonalna protutijela), odnosno uz 1% normalnog konjskog (za monoklonalna protutijela) seruma s dodatkom tritona. Kod rezova obrađenih na GAD67, GAD65 i Mash1 kod određenih eksperimenata izostavljen je triton (Esclapez i sur., 1994).

Nakon inkubacije u primarnom protutijelu rezovi su isprani tri puta po 30 minuta u KPBS te inkubirani tijekom jednog sata u otopini sekundarnog protutijela; biotinizirano protutijelo protiv zečjeg IgG razvijeno u koze ili biotinizirano protutijelo protiv mišjeg IgG razvijeno u konja (Vector Laboratories). Razrjeđenje sekundarnih protutijela bilo je 1:200 u KPBS-u s 3% normalnog kozjeg ili normalnog konjskog seruma.

Nakon toga rezovi su ponovo isprani tri puta po 30 minuta u KPBS, a zatim inkubirani tijekom jednog sata u otopini avidin-biotin-peroksidaze (Vectastatin Elite ABC, Vector Laboratories, Burlingame, CA) ili streptavidin – biotin-peroksidaze (Amersham, Little Chalfont, UK) pripremljenoj prema uputama proizvođača. Nakon nekoliko ispiranja u KPBS, uslijedio je postupak razvijanja boje pomoću DAB kompleksa: rezovi su obrađeni tijekom 10 minuta u 0,04% otopini 3-3-diaminobenzidina-HCl (DAB) i 0,006% otopini vodikovog peroksida razrijeđenoj u KPBS (bidestilirana voda). Zatim su rezovi ponovo isprani u KPBS, položeni na želatinizirana stakla, osušeni, dehidrirani te prekriveni sredstvom Permount (Fisher Scientific, Electron Microscopy Sciences, Washington, PA).

#### 4.2.2.2 Dvostruko imunohistokemijsko bojenje

Dvostruko bojenje na GAD65 i Mash1, GAD67 i Mash1, GAD67 i NeuN izvršeno je koristeći fluorescentni protokol uz uzastopnu imunodetekciju na 4°C.

Prvo su obrađeni rezovi na GAD65, odnosno GAD67. Rezovi obrađeni na GAD65 isprani su 30 min u KPBS, inkubirani tijekom jednog sata u KPBS s 3% normalnim konjskim serumom (Vector Laboratories) te inkubirani preko noći u GAD-6 mišjem monoklinalnom protutijelu (Chemicon) razrijeđenim u KPBS s 1% normalnim konjskim serumom (Vector Laboratories). Rezovi obrađeni na GAD67 isprani su 30 min u KPBS, inkubirani tijekom jednog sata u KPBS s 3% normalnim kozjim serumom (Vector Laboratories) te inkubirani preko noći u K2 antiserumu zečjem poliklinalnom protutijelu (Chemicon) razrijeđenim u KPBS s 1% normalnim kozjim serumom (Vector Laboratories).

Nakon inkubacije u primarnom protutijelu rezovi su isprani tri puta po 30 minuta u KPBS te inkubirani tijekom jednog sata u otopini sekundarnog protutijela; biotinizirano protutijelo protiv mišjeg IgG miša razvijeno u konja ili biotinizirano protutijelo protiv zečjeg IgG razvijeno u koze (1:200). Nakon toga rezovi su ponovo isprani u KPBS te zatim inkubirani tijekom dva sata u otopini Alexa 488--conjugated Streptavidin (1:200, Jackson Immunoresearch, West Grove, PA).

Nakon ispiranja tri puta po 30 minuta u KPBS, rezovi su obrađeni na Mash1. Rezovi su obrađeni na Mash1 koristeći mouse on mouse (MOM) kit (Vector Laboratories) prema uputama proizvođača. Rezovi su inkubirani tijekom jednog sata u mišjem IgG blokirajućem reagensu i preko noći u Mash1 mišjem monoklinalnom protutijelu (1:100). Zatim su isprani tri puta po 30 minuta u KPBS te inkubirani dva sata u Cy3-konjugiranom kozjem anti-mišjem IgG (1:200, Jackson Immunoresearch) razrijeđenim u KPBS. Zatim su rezovi ponovo isprani u KPBS, položeni na želatinizirana stakla, osušeni, dehidrirani te prekriveni sredstvom Gel/Mount (Biomedica, Foster City, CA). Rezovi su analizirani Olympus fluoview-500 laser scanning mikroskopom.

Dvostruko bojenje na somatostatin i NeuN izvršeno je nefluorescentnom metodom prema protokolu opisanom u (Dinocourt i sur., 2003).

Rezovi su tijekom jednog sata inkubirani u KPBS s tritonom uz 2% blokirajući reagens; (Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France). Rezovi su zatim inkubirani tijekom 48 sati u otopini somatostatin antiseruma (1:4,000) i NeuN protutijela (1:4,000) razrijeđenoj u KPBS s Tritonom.

Detekcija somatostatina je učinjena standardnom ABC metodom. Rezovi su tijekom jednog sata inkubirani u biotiniziranom protutijelu protiv zečjeg IgG razvijeno u koze (1:200). Razrjeđenje sekundarnog protutijela bilo je 1:200 u KPBS-u s 0.5% blokirajućim reagensom. Nakon ispiranja u KPBS kroz 30 min, slijedi inkubacija tijekom jednog sata u otopini ABC

kompleksa (Vector Laboratories) pripremljenoj prema uputama proizvođača. Zatim slijedi postupak razvijanja boje: rezovi su obrađeni u 0,04% DAB, 0.03% nikl amonijum sulfatu i 0,006% otopini vodikovog peroksida razrijeđenoj u KPBS (DAB-Nickel) koje daje intenzivnu plavu reakciju. Zatim su rezovi ponovo isprani u KPBS i obrađeni za detekciju NeuN sa avidin—biotin—alkalna fosfataza (ABC-AP) metodom. Rezovi su tijekom jednog sata inkubirani u biotiniliranom protutijelu protiv mišjeg IgG razvijeno u konja (1:200). Razrjeđenje sekundarnog protutijela bilo je 1:200 u KPBS-u s 0.5% blokirajućeg reagensa. Nakon ispiranja u KPBS kroz 30 min, slijedi inkubacija tijekom jednog sata u otopini ABC-AP kompleksa (Vector Laboratories) pripremljenoj prema uputama proizvođača. Aktivnost alkalne fosfataze detektirana je s brzim crvenim kromogenom (Roche Molecular Biochemicals) razrijeđenim u 0.1% u 0.1 molarnoj Tris HCl, pH 8.2; što dovodi do formiranja crvenog precipitata. Rezovi su položeni na želatinizirana stakla, osušeni, dehidrirani te prekriveni sredstvom Permount (Fisher Scientific, Electron Microscopy Sciences, Washington, PA).

#### **4.2.3 Digitalna rekonstrukcija i kvalitativna analiza histoloških rezova**

Upotrebom automatiziranog Olympus-PROVIS sustava sa nadograđenom Nikon (Eclipse DXM 1200) digitalnom video kamerom visoke rezolucije analizirano je više od 300 rezova impregniranih Golgi i Nissl metodom te oko 650 rezova obrađenih imunohistokemijskim metodama. Analizirane su morfologija i distribucija stanica te laminacija medijalne i dorzo-lateralne stijenke telencefalona. Najuspješnije impregnirani neuroni su fotografirani u jednom ili više fokusa. Fotografije su obrađene koristeći računalni program AdobePhotoShop. Digitalizirane fotografije su naknadno obrađene izmjenjujući kontrast i oštrinu na način da su u konačnom prikazu bile vidljive sve stanične strukture kao i na izvornoj digitalnoj fotografiji. Izvorne digitalne fotografije raspoložive su na zahtjev. Rekonstrukcija je provedena na mikroskopsko-računalnom sustavu koristeći računalni program Neurolucida. Sustav se sastoji od MBF-DV-46 digitalne kamere koja se nalazi na Olympus BX61 mikroskopu motoriziranom za kretanje u dubinu te motoriziranog stolića za pokretanje u x-y smjeru i koji je kontroliran MAC 5000 elektroničkim upravljačem (Ludl Electronics Products Ltd.)

## 5. REZULTATI

U ovom istraživanju analiziran je dio arhivskog histološkog materijala kao i novo obrađeni rezovi dostupnog tkiva embrionalnih i fetalnih mozgova. Iako su svi mozgovi rezani u koronalnoj ravnini, ravnine rezanja značajno se razlikuju unutar analiziranog materijala. Velik dio arhivskog majmunskog materijala iz ranog fetalnog razdoblja značajno odstupa od koronalne ravnine definirane u literaturi (O’Rahilly i Müller, 2006). Također, u novo obrađenom materijalu koronalna ravnina definirana je više prema vrhu razvijenog odraslog frontalnog reznja, što također predstavlja odstupanje. Stoga dio materijala analiziran u ovoj studiji, posebno u stadiju E46 i E48, uključuje rezove postavljene pod kutom od gotovo 90° (slika 5.1). Problematika promjene struktura telencefalona tijekom razvoja i odnosi prema odraslom mozgu, s posebnim naglaskom na promjene u strukturama medijalnog telencefaličkog zida, prikazana je na slici 5.2.

## **5.1 STADIJ I U MAJMUNA (E44-E50) I ČOVJEKA (7-10PCW): PRIJELAZ EMBRIONALNOG U RANO FETALNO RAZDOBLJE**

Prijelaz embrionalnog u rano fetalno razdoblje karakteriziraju značajne promjene u veličini i omjeru te položaju različitih dijelova proencefalona. Dorzalni dio telencefalona i lateralne moždane komore tek se počinju razvijati, a bazalni dijelovi telencefalona dominantno su vezani uz treću moždanu komoru (slika 5.3). Razvojne promjene potrebno je uzeti u obzir prilikom morfološke analize materijala u ovom razdoblju.

### **5.1.1 Tangencijalna migracija u čovjeka između 7. i 10. tjedna nakon začeća**

Najranije analizirani embrij u ovoj studiji bio je duljine CRL 25mm i starosti 6,5 tjedana nakon začeća. U ovog embrija već su jasno razvijeni telencefalički mjehurići, ali je otvor s diencefaličkom komorom masivan (slika 5.4). Osnova hipokampusa je jasno izražena, a koroidni splet je u početnom stadiju stvaranja. Diencefalički mjehurić s bazalnim dijelom telencefalona je još uvijek značajno veći od palijuma, a lateralni ganglijski brežuljak je prisutan, no manji od medijalnog. Ova morfološka obilježja ukazuju da se embrij nalazi u Carnegie stadiju 19 (slika 5.3), što odgovara starosti od 6,5 tjedana (O’Rahilly i Müller, 2006). Međutim, sama veličina embrija ukazuje da se moguće radi i o kasnijem stadiju, čak i o stadiju CS21. U prilog tome govori i dobro razvijena primordijalna ploča koja se nalazi iznad osnove lateralnog ganglijskog brežuljka, ali u bazalnom dijelu ulazi duboko u lateralnu stijenku. Također, u području gdje je diencefalo-telencefalički žlijeb najizraženiji jasno se vide talamička vlakna koja urastaju u strijatum te se već prepoznaju budući kaudatus i putamen. Prema podacima iz literature kapsula interna je jasno razvijena u CS22, što bi ukazivalo da se ovaj embrij nalazi na prijelazu CS21 u CS22.

Prema primordijalnoj/kortikalnoj ploči se iz kaudalnog dijela medijalnog ganglijskog brežuljka i rostralnog dijela diencefaličkih proliferativnih zona protežu snopovi gusto poredanih, bipolarnih stanica izduženih u tom smjeru (slika 5.4C). To ukazuje da prve stanice koje oblikuju primordijalnu/kortikalnu ploču imaju diencefaličko porijeklo, s obzirom na to da se medijalni ganglijski brežuljak razvija iz diencefaličke osnove. Tangencijalna migracija prisutna je i u području arhikorteksa gdje započinje stanjivanje telencefalona i razvoj koroidnog spleta, na mjestu spajanja telencefaličkih mjehurića (slika 5.5). Upravo iz tog mjesta stanice se usmjeravaju subprijalno kroz medijalnu stijenku do vrha telencefalona te već u ovom stadiju oblikuju sloj jednog reda rijetko poredanih stanica.

U ovom stadiju ventrikularna zona je dominantna proliferativna zona iako je u bazalnim dijelovima subventrikularna zona dobro razvijena, ali još uvijek tanja od ventrikularne. Subventrikularna zona se polako stanjuje prema vrhu telencefaličkog

mjhurića dok u medijalnom zidu ova zona još nije razvijena. Kroz medijalni telencefalički zid se pak primordijalna marginalna zona proširuje od vrha prema mjestu spajanja telencefaličkih mjeruća te je u području arhikorteksa najdeblja (slika 5.5C).

Na samom početku fetalnog razdolja (9PCW) telencefalički mjhurići s osnovom neokorteksa i arhikorteksa su dobro razvijeni, ali ipak još dominiraju talamus i bazalni telencefalon (slika 5.6). Talamokortikalna vlakna odjeljuju kaudatus od putamena. Središnji dio palijuma ima laminaciju tipičnu za rano fetalno razdoblje: kortikalna ploča je već dobro razvijena, intermedijalna je najšira zona, a ventrikularna i subventrikularna zona su približno jednake debljine. Tipična rana fetalna laminacija izražena je i na najudaljenijim dijelovima budućeg neokorteksa, neposredno do osnove hipokampusa, iako su sve zone stanjene u odnosu na lateralnu stijenku. Najveća razlika u odnosu na lateralnu stijenku je vrlo tanka intermedijalna zona (slika 5.7).

U ranom postembrionalnom razdoblju (10PCW) na Golgi preparatima cijelom širinom zida lateralnog telencefalona dominiraju radijalno orijentirane, migrirajuće stanice i stanice kortikalne ploče koje su završile migraciju. Najveći broj tangencijalno orijentiranih stanica nalazi se u subventrikularnoj zoni. Najdublje smještene stanice kortikalne ploče počinju se diferencirati i poprimati obilježja tipičnih piramidnih neurona pa apikalni dendrit već doseže do pije i razgranjuje se unutar marginalne zone. Ispod kortikalne ploče mogu se zapaziti stanice koje su se počele diferencirati, ali uglavnom nisu smještene neposredno ispod već dublje u donjoj trećini intermedijalne zone (slika 5.8).

U ovom razdoblju osnova hipokampusa je jasno prepoznatljiva. U prijelaznom mezokortikalnom području kortikalna ploča je sastavljena od 3 do 5 redova stanica, a subventrikularna zona je također jako stanjena te je 3 do 4 puta tanja od ventrikularne. U području budućeg hipokampusa subventrikularna zona se nastavlja u tanku zonu sporadično postavljenih subventrikularnih stanica. Prema arhikorteksu se iznad subventrikularne zone kroz srednju trećinu zida nalaze brojne difuzno raspoređene stanice koje u području hipokampusa formiraju otočiće gusto zbijenih stanica (slika 5.9).

Na preparatima obrađenim Nissl metodom između kaudatusa i ganglijskog brežuljka nalazi se zona koja se nastavlja u sloj stanica koji u ventralnim dijelovima telencefalona oblikuje iznimno široku zonu između subventrikularne i intermedijalne (5.7C i 5.7D). Ova zona se stanjuje prema dorzalno i gubi se oko sredine lateralnog telencefaličkoga zida. Unutar zone dominiraju tangencijalno položene stanice te ona zapravo predstavlja lateralni migratorni put. U ventralnom dijelu lateralne stijenke palijuma ispod kortikalne ploče prisutna je zona sličnih obilježja koja se razlikuje od kortikalne ploče po tome što su stanice nešto rjeđe i većinom tangencijalno postavljene (5.7C). Zona ispod kortikalne ploče tri puta je tanja od kortikalne ploče te se gubi prije nego zona iznad subventrikularne. Ovu zonu

najvjerojatnije oblikuju tangencijalno migrirajuće stanice koje dolaze iz bazalnog dijela telencefalona.

Na Nissl preparatima se u bazalnom dijelu telencefalona vidi gomilanje stanica koje dolaze iz susjednih proliferativnih zona. Tu je dominantna proliferativna zona oko vrha temporalnog režnja koja je blisko položene prema proliferativnim zonama bazo-lateralnog dijela diencefalona. To se posebno odnosi na proliferativnu zonu hipotalamusa, koja je relativno stanjenja, ali u bazalnom dijelu još uvijek intenzivno obojena što ukazuje na značajnu proliferaciju. Dojam je da postoji kontinuitet proliferativnih zona hipotalamusa, preoptičkog područja, bazalnog telencefalona, septuma i paleokortikalnog ventrikula (buduće proliferativne zone vrha temporalnog režnja) (slika 5.6).

Na Golgi preparatima se na prijelazu ganglijskog brežuljka u septalnu proliferativnu zonu (vrh paleokortikalnog ventrikula) odvajaju stanice koje se usmjeravaju prema bazalno te se zatim nagomilavaju na bazalnoj površini i dalje šire kroz marginalnu zonu, više prema septalno i u medijalni zid nego u lateralnu stijenu palijuma (slika 5.11A). Također, u medijalnom zidu vide se stanice koje migriraju prema ventralno i dorzalno u marginalnu zonu, a dolaze s mjesta pregiba arhikortikalne zone prema koroidnom spletu (slika 5.11B), kao i dorzalnije iz stanjenog dijela medijalnog telencefaličkog zida gdje se nalazi osnova forniksa (slika 5.12). Na završetku medijalnog zida, ventrikularna zona koja se nastavlja na hipokampalnu intenzivno je obojena, kao i proksimalni dijelovi koroidnog spleta (slika 5.10). To ukazuje kako su proliferativne zone paleokortikalnog ventrikula, prijelaznih zona prema koroidnom spletu i proliferativna zona koja se nalazi ispod osnove forniksa glavni izvor stanica koje u ovom stadiju ulaze u marginalnu zonu. No, na Nissl preparatima nema mnogo stanica u marginalnoj zoni, ali se subprijalno ipak u većem dijelu palijalne osnove može uočiti jedan red, ne pregusto poredanih stanica, dok je u području arhikorteksa i hipokampusa jasno vidljiv sloj subprijalno postavljenih stanica koji dolazi od proliferativne zone na granici prema koroidnom spletu.

## Deskriptivna analiza Nissl i Golgi rezova

**Slika 5.1** Crteži mozga fetusa s presjecima prema kojima su analizirani rezovi (slike modificirane prema O'Rahilly i Müller, 2006).

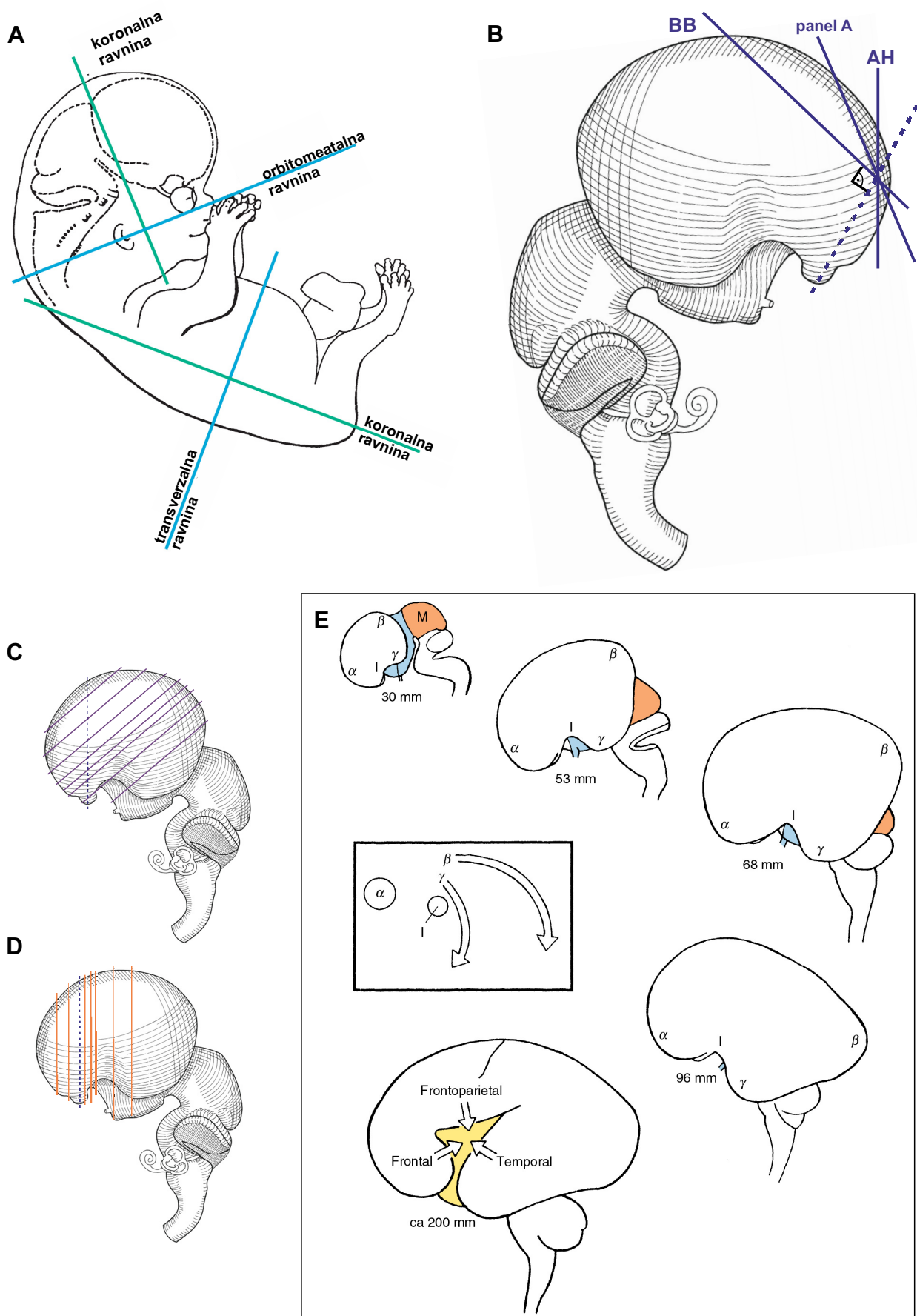
Paneli A-D prikazuju mozak čovjeka na samom početku fetalnog razdoblja, starosti oko 8 tjedana (CRL 42mm). Prema crtežima mozga fetusa iz istraživanja Streetera (1918), Hinesa (1922) i Padgeta (1948, 1957) napravljene su razine presjeka mozga majmuna tijekom ranog fetalnog razdoblja (E46-E55) i čovjeka tijekom kasnog embrionalnog i ranog fetalnog razdoblja (starosti 7-11 tjedana) prema kojima su analizirani presjeci u ovom istraživanju.

Panel A pokazuje mozak čovjeka *in situ* na samom početku fetalnog razdoblja, starosti oko 8 tjedana (CRL 42mm) te smještaj dijelova mozga unutar lubanje fetusa. Lice je postavljeno okomito kako bi se omogućila usporedba s odraslom osobom (vidi i panel E). Primjetno je kako se ravnine ne preklapaju s istovjetnim ravninama u odrasle osobe. Razumijevanje ovog problema bitno je zbog različitog definiranja presjeka u različitim studijama (B). Primjerice, koronalna ravnina definirana na panelu A pomaknuta je za 20° u smjeru suprotnom od kazaljke na satu u odnosu na ravninu paralelnu s okomicom lica (panel B, linija AH).

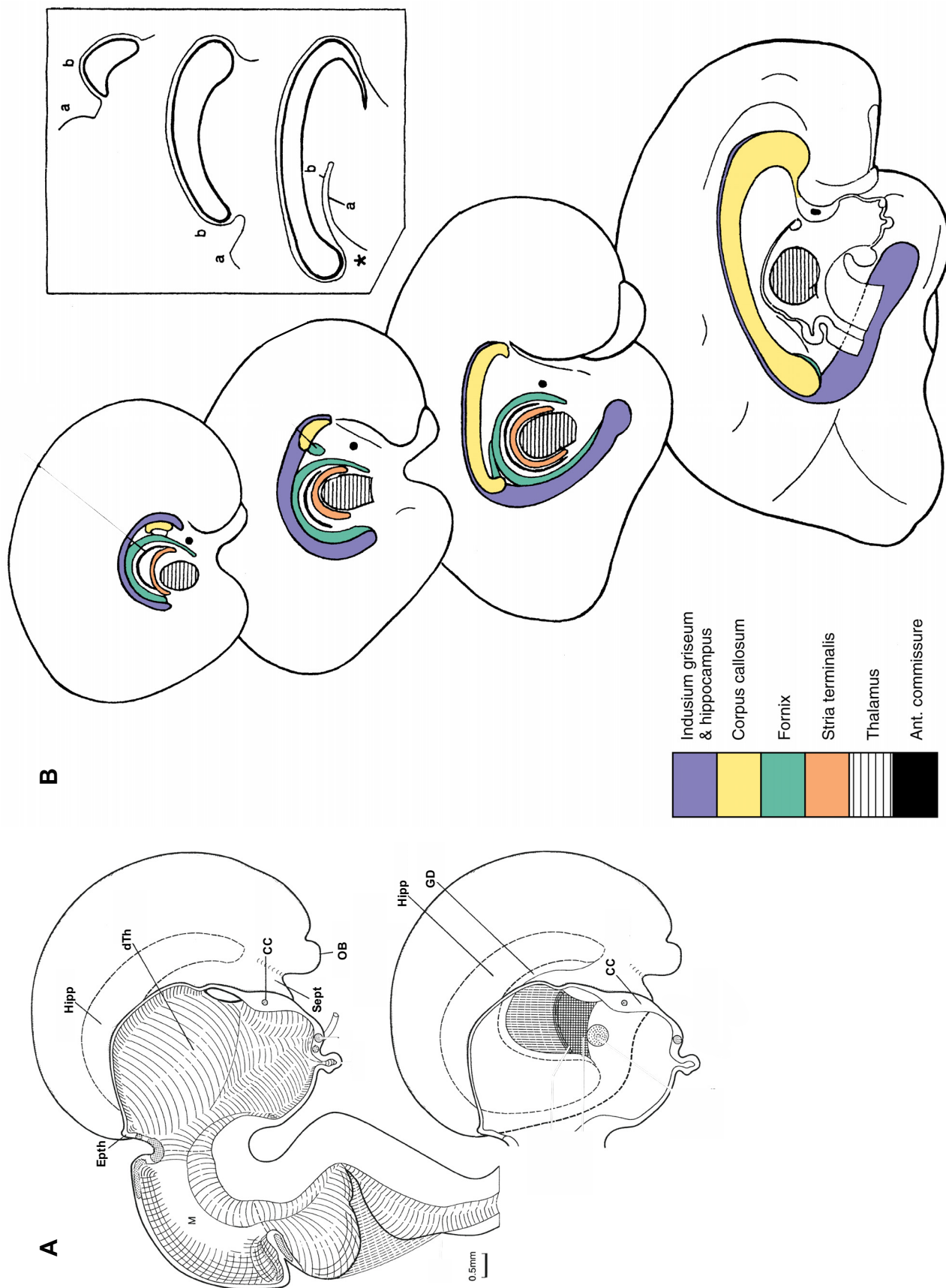
Panel B pokazuje kako je u prijašnjim studijama (Berger i sur., 1993, Berger i Alvarez, 1996, Berger i sur., 1999, Berger i sur., 2001) definiran koronalni presjek na arhivskom materijalu majmuna tijekom ranog fetalnog razdoblja koji je analiziran u ovoj studiji (sada dio zbirke majmunskih mozgova dr. Monique Esclapez) i dvostruko više pomaknut od koronalne ravnine definirane na panelu A (O'Rahilly i Müller, 2006), dok su novi preparati napravljeni u okviru ovog istraživanja rezani paralelno s ravninom okomice lica te je to definirano kao koronalna ravnina (AH). Međutim, i ovaj presjek pomaknut je na ravninu koja je okomita na budući frontalni vrh telencefalona (isprekidana linija) pa presjek na arhivskom materijalu (BB) zapravo prolazi budućom transverzalnom ravninom, dok je presjek na novo obrađenim rezovima ukošen oko 20° u odnosu na odraslu koronalnu ravninu. Presjeci na arhivskom materijalu (C, pune linije) za gotovo 60° pomaknuti su u odnosu na materijal pripremljen za ovo istraživanje (D, isprekidana linija na C).

Panel E pokazuje lateralnu stranu mozga tijekom fetalnog razdoblja. Samo je buduća inzula (I) relativno stacionarno postavljena, dok se od frontalno ( $\alpha$ ) prema temporalno ( $\gamma$ ) pozicija područja pomiče u smjeru kazaljke na satu pa tako okcipitalni vrh ( $\beta$ ) iz dorzalne dolazi u kaudalnu poziciju.





**Slika 5.1** Crteži mozga fetusa s presjecima prema kojima su analizirani rezovi (slike modificirane prema O'Rahilly i Muller 2006).



**Slika 5.2** Medijalna strana mozga fetusa (modificirano prema O'Rahilly i Muller 2006).

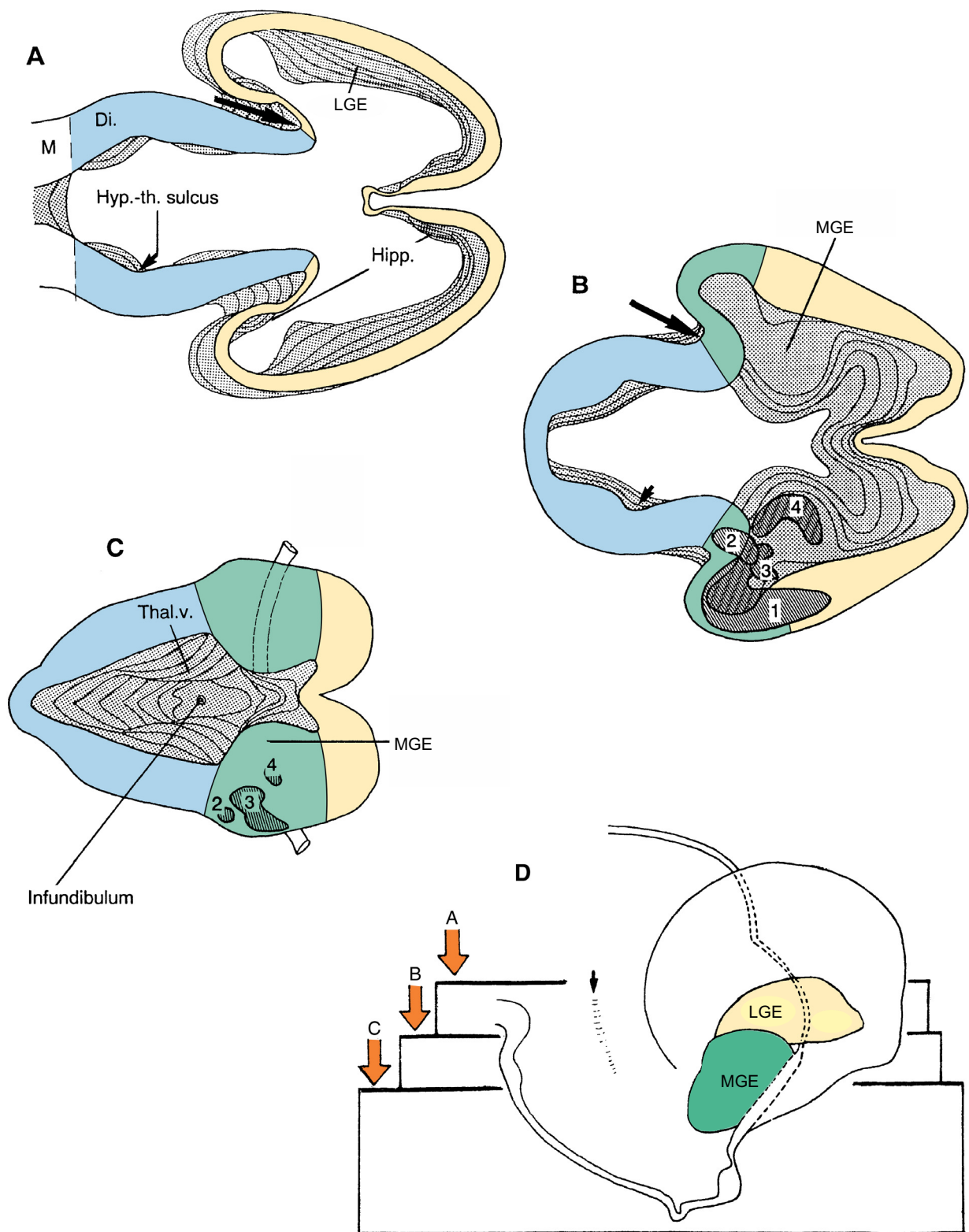
**Slika 5.2** Medijalna strana mozga fetusa (modificirano prema O’Rahilly i Müller, 2006)

Panel A prikazuje mozak čovjeka na samom početku fetalnog razdoblja, starosti oko 8 tjedana (CRL 42mm). Donji medijalni presjek prikazan je da se kroz proziran prozencefalon vide hipokampus, područje dentatusa, area epitelialis i koroidna fisura. Treba obratiti pažnju da je u ovom stadiju hipokampus dobro razvijen u cijeloj dužini od septuma do u vrh budućeg temporalnog režnja te zauzima značajno veće područje nego u kasnijim fetalnim stadijima (B).

Panel B prikazuje promjene medijalne strane mozga kod fetusa dužine 80mm (A), 95mm (B), 150mm (C) i 265mm (D). Desni gornji dio slike shematski pokazuje odnose meke moždane ovojnice i korpusa kalozuma kod fetusa dužine 100 mm, 170 mm i kod rođenja. Ovaj crtež mozga fetusa napravljen je prema modelu Keibela i Malla (1912).

**Slika 5.3** Presjeci kroz prozencefalon na različitim razinama u embrija starog 6,5 tjedana (CRL 20mm) (modificirano prema O’Rahilly i Müller, 2006).

Na slici su prikazani presjeci (A-C) kroz prozencefalon na različitim razinama (D) u embrija starog 6,5 tjedana (CRL 20mm). Ovaj stadij i način presjeka istovjetan je najranije opisanom stadiju u ovom istraživanju. Veća strelica označava telencefaličko – diencefalički žlijeb. Manja strelica označava hipotalamičko – talamički žlijeb. Brojevi na panelima B i C označavaju amigdaloidni kompleks, (1) kortikalne, (2) medijalne, (3) prednje i (4) bazolateralne jezgre. Amigdaloidni kompleks nalazi se u budućem temporalnom režnju, a stanice dolaze iz medijalnog ganglijskog brežuljka. Lateralni ganglijski brežuljak nalazi se na krovu interventrikularnog otvora (A), dok je medijalni brežuljak rostralna ekstenzija diencefalona.



**Slika 5.3** Presjeci kroz prozencefalon na različitim razinama u embrija starog 6,5 tjedana (CRL 20mm) (modificirano prema O'Rahilly i Muller 2006).

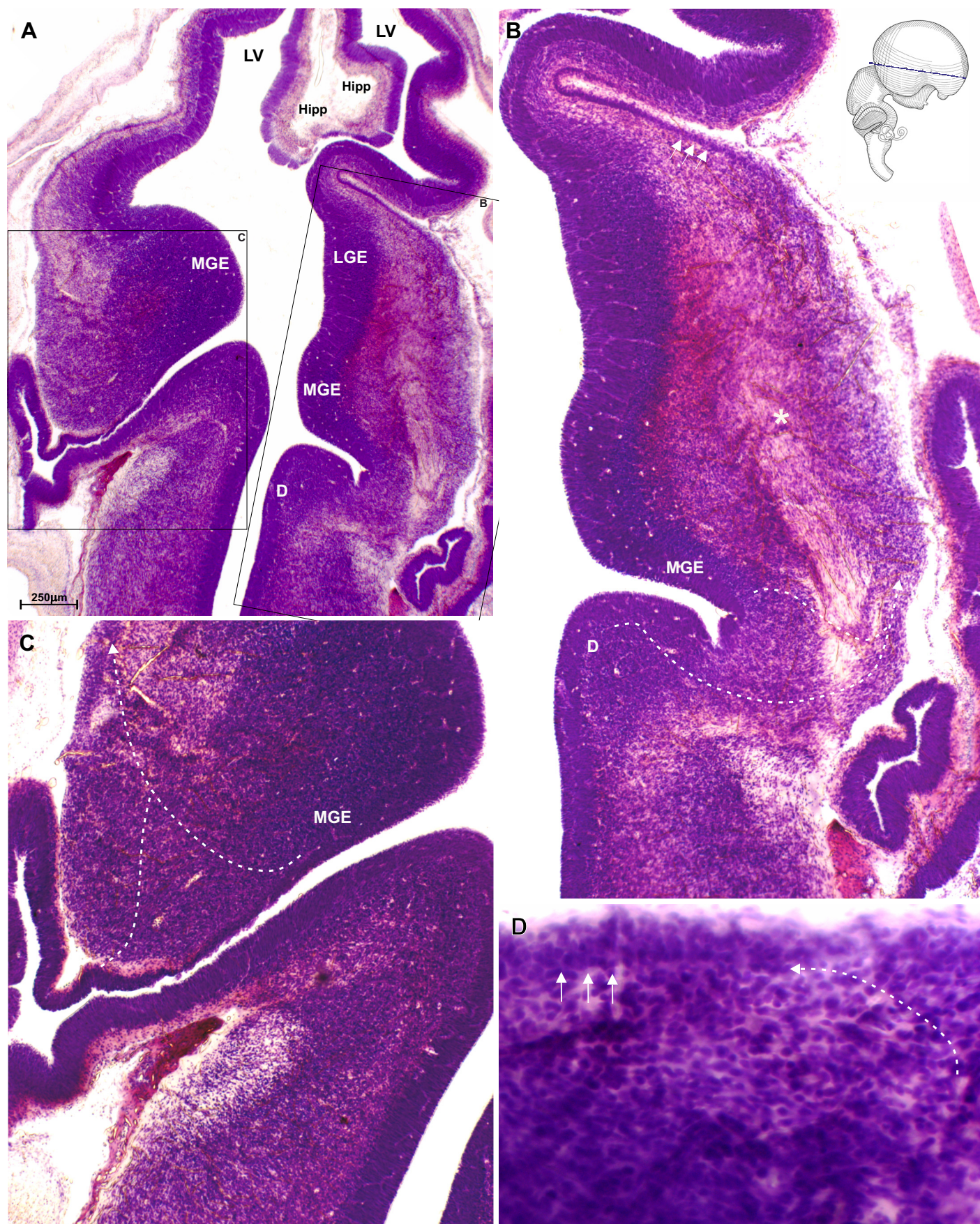
**Slika 5.4** Embrij čovjeka star 6,5 tjedana, rezovi obojeni Nissl metodom. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli B i C.

U ovom stadiju već je jasno razvijen telencefalički mjehurići (A), iako je otvor s diencefaličkom komorom masivan. Osnova hipokampusa je također jasno izražena, a koroidni splet je u početnom stadiju stvaranja. Panel B označava nešto dorzalniji presjek u odnosu na panel C pa se na desnoj strani slike vidi osnova strijatuma koju diskretni snop vlakana (zvjezdica) koji dolazi od talamusa razdvaja na kaudatus i putamen (B). Lijeva strana presjeka (C) prolazi kroz osnovu akumbensa i struktura bazalnog telencefalona. Vidljiv je masivan snop stanica koje odlaze iz kaudalnog dijela medijalnog ganglijskog brežuljka (strelica) i rostralnog dijela diencefaličkih proliferativnih zona (strelica druga) lateralno prema pijalnoj površini te se zatim iznad strijatuma usmjeravaju rostralno prema telencefalonu i oblikuju ploču od 2-3 reda gusto zbijenih stanica (tri male strelice) (B). Ova ploča dobro je razvijena u kaudalnom dijelu sredine telencefaličkog mjehurića, dok u rostralnim, dorzalnim i ventralnim dijelovima telencefalona ona još nije jasno razvijena. Najvjerojatnije se radi o stanicama koje oblikuju primordijalnu ploču. Snop migratornih stanica polazi od mjesta gdje se spajaju proliferativne zone ganglijskog brežuljka i diencefalona (B) te mjesta gdje dolazi do stanjenja proliferativnih zona koje se pružaju prema ventro-lateralnim dijelovima telencefalona i gdje započinje stanjivanje telencefaličkog zida (C). Ove proliferativne zone u kasnijem stadiju postaju proliferativne zone medijalnog dijela ganglijskog brežuljka, septalnog područja, preoptičke areje, hipotalamusa, paleokortikalnog ventrikula i vrha temporalnog režnja. Panel D pokazuje pijalni dio na prijelazu subpalijuma u palijum, na mjestu gdje se počinje formirati primordijalna ploča. Vidljive su stanice koje iz subpalijuma migriraju prema površini (strelica).

**Slika 5.5** Embrij čovjeka star 6,5 tjedana, rezovi obojeni Nissl metodom.

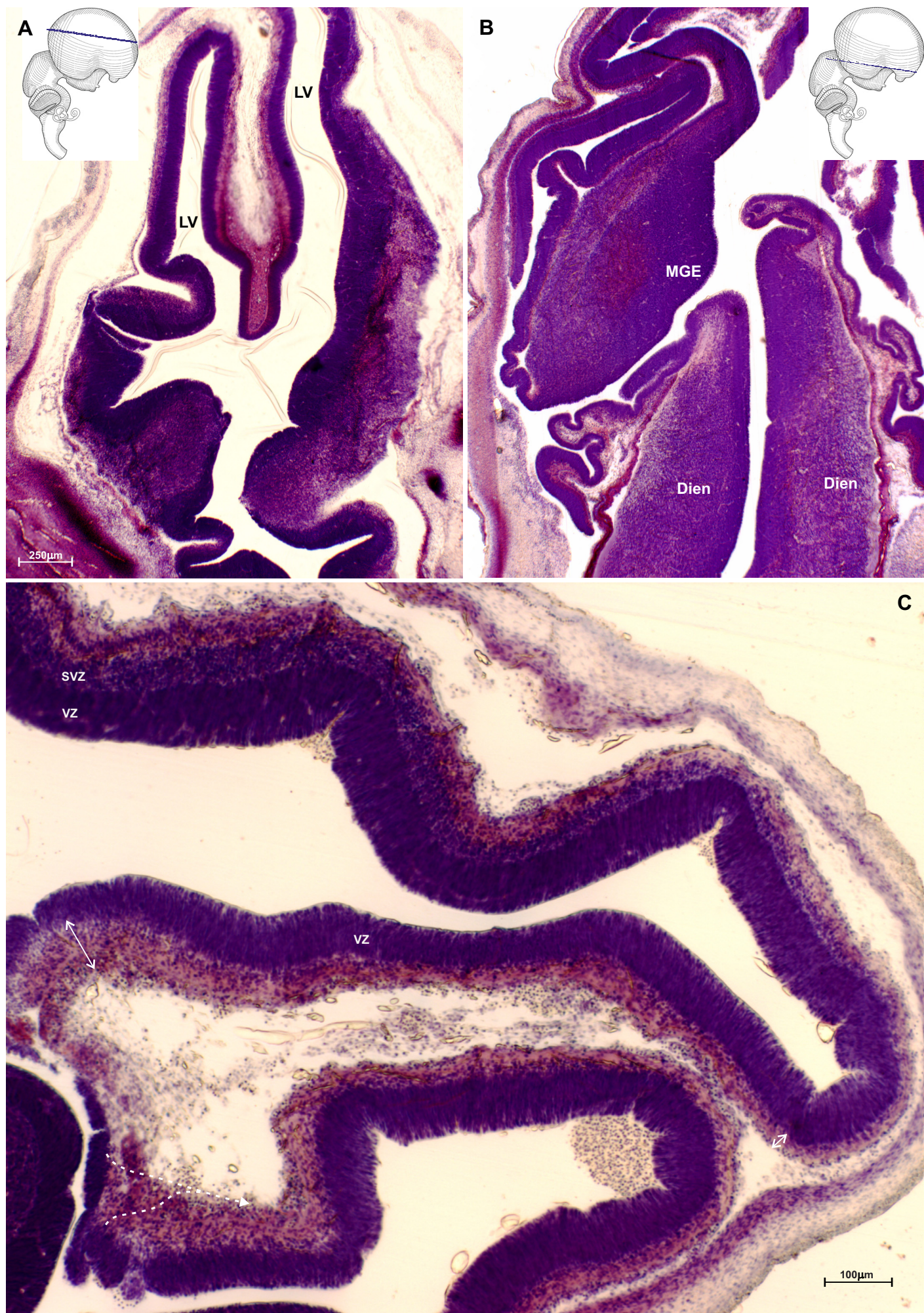
Panel A je dorzalnije, a panel B je ventralnije smješten rez u odnosu na presjek sa slike 5.4. Na svim presjecima jasno je vidljivo kako je medijalni dio ganglijskog brežuljka anatomske dio diencefalona, ali i osnova lateralnog u ovom stadiju tvori rostralni dio zida diencefaličke komore. Panel C prikazuje telencefalona u području budućeg neokorteksa i hipokampusa. U ovom stadiju ventrikularna zona je dominantna proliferativna zona iako je u bazalnim dijelovima subventrikularna zona dobro razvijena, ali još uvijek tanja od ventrikularne. U ovim dijelovima je jasno razvijena i primordijalna ploča. Subventrikularna zona se polako stanjuje prema vrhu telencefaličkog mjehurića dok u medijalnom zidu ova zona još nije razvijena. Kroz medijalni telencefalički zid se proširuje primordijalna marginalna zona od vrha prema mjestu spajanja telencefaličkih mjeruća, dok je u području budućeg arhikorteksa vidljivo najveće zadebljanje primordijalne marginalne zone, a ventrikularna se zona stanjuje (veća i manja dvostruka strelica). U dijelu koji čini osnovu budućeg





**Slika 5.4** Embrij čovjeka star 6,5 tjedana, rezovi obojeni Nissl metodom. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli B i C.





**Slika 5.5** Embrij čovjeka star 6,5 tjedana, rezovi obojeni Nissl metodom.



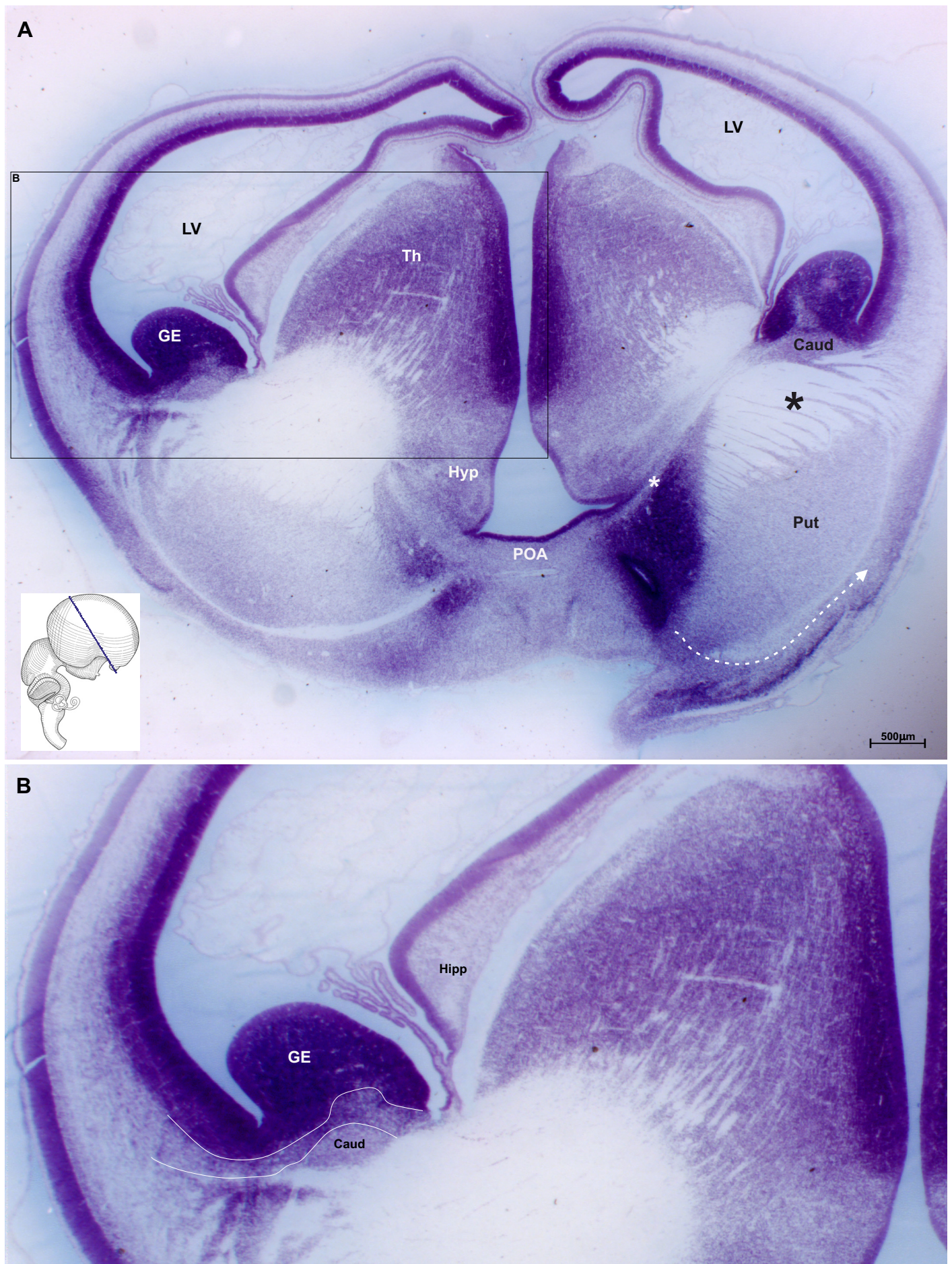
hipokampusa primordijalna marginalna zona dvostruko je deblja od ventrikularne zone. U području arhikorteksa (strelica) gdje započinje stanjivanje telencefalona i razvoj koroidnog spleta vidljivo je subpijalno nakupljanje stanica i formiranje subpijalnog sloja stanica prema telencefalonu.

**Slika 5.6** Fetus čovjeka star 9 tjedana, rezovi obojeni Nissl metodom. Pravokutnik označen na panelu A uvećano je prikazan kao panel B.

Presjek prolazi kroz središnji dio talamusa na mjestu masivnog spoja sa telencefalonom te se na presjeku prikazuje bazalni telencefalon. Na panelu A prikazani su dobro razvijeni telencefalički mjehurići s osnovom neokorteksa i arhikorteksa, ali dominiraju talamus i bazalni telencefalon. Na presjeku su jasno vidljiva urastajuća talamokortikalna vlakna (crna zvjezdica) koja djeluju dosta masivno u odnosu na veličinu telencefalona te odjeljuju kaudatus od putamena. Oko vrha temporalnog režnja vidljiva je masivna zona proliferacije od kuda se stanice gomilaju prema bazi gdje se piriformni korteks nastavlja u olfaktorni bulbus te zatim prema lateralno (isprekidana strelica). Proliferativna zona u području hipotalamusa je relativno stanjenja u odnosu na talamus, ali u bazalnom dijelu još uvijek intenzivno obojena, no ipak relativno tanka u odnosu na ostale prozencefaličke proliferativne zone. Na desnoj strani presjeka vidljive su blisko položene proliferativne zone bazo-lateralnog dijela diencefalona i vrha temporalnog režnja (bijeli zvjezdica). Ovi podaci pokazuju kontinuitet proliferativne zone hipotalamusa, preoptičkog područja, bazalnog telencefalona, septuma i paleokortikalnog ventrikula (buduće proliferativne zone vrha temporalnog režnja).

Panel B jasnije prikazuje masivnost proliferativne zone talamusa koja je u ovom dijelu deblja od proliferativnih zona telencefalona. Također je vidljivo kako je već u ovom razdoblju osnova hipokampusa jasno prepoznatljiva te pokazuje intenzivno obojenje ventrikularne zone medijalnog telencefaličkog zida i proksimalnog dijela koroidnog spleta. Sve navedeno ukazuje na značajnu proliferaciju u ovim područjima. U području između kaudatusa i ganglijskog brežuljka jasno je izražena i zona (ravne linije) koja se nastavlja u sloj stanica koji u ventralnim dijelovima telencefalona oblikuje iznimno široku zonu između subventrikularne i intermedijalne (uvećan prikaz na slici 5.7). Orijentacija stanica i obrazac stanjenja ove zone od ventralno prema dorzalno ukazuje da unutar nje dominiraju tangencijalno migrirajuće stanice koje dolaze iz ganglijskog brežuljka.





**Slika 5.6** Fetus čovjeka star 9 tjedana, rezovi obojeni Nissl metodom. Pravokutnik označen na panelu A uvećano je prikazan kao panel B.

**Slika 5.7** Fetus čovjeka star 9 tjedana, rezovi obojeni Nissl metodom. Paneli A-D prikazuju uvećane dijelove presjeka prikazanog na slici 5.6, a točne pozicije prikaza označene su pravokutnicima na umanjenom presjeku reza.

Središnji dio palijuma s tipičnom ranom fetalnom laminacijom, dobro razvijenom kortikalnom pločom, intermedijalnom i proliferativnom zonom prikazan je na panelu B (koji je zaokrenut za 90°). Na ovom dijelu intermedijalna je najšira zona, ali su i proliferativne zone relativno masivne te približno jednake debljine. Tipična rana fetalna laminacija izražena je i na najudaljenijim dijelovima budućeg neokorteksa (A) na dijelu koji se nalazi u medijalnom telencefaličkom zidu neposredno do osnove hipokampusa, iako su sve zone stanjene u odnosu na lateralnu stijenku. Najveća razlika u odnosu na lateralnu stijenku je dosta tanka intermedijalna zona.

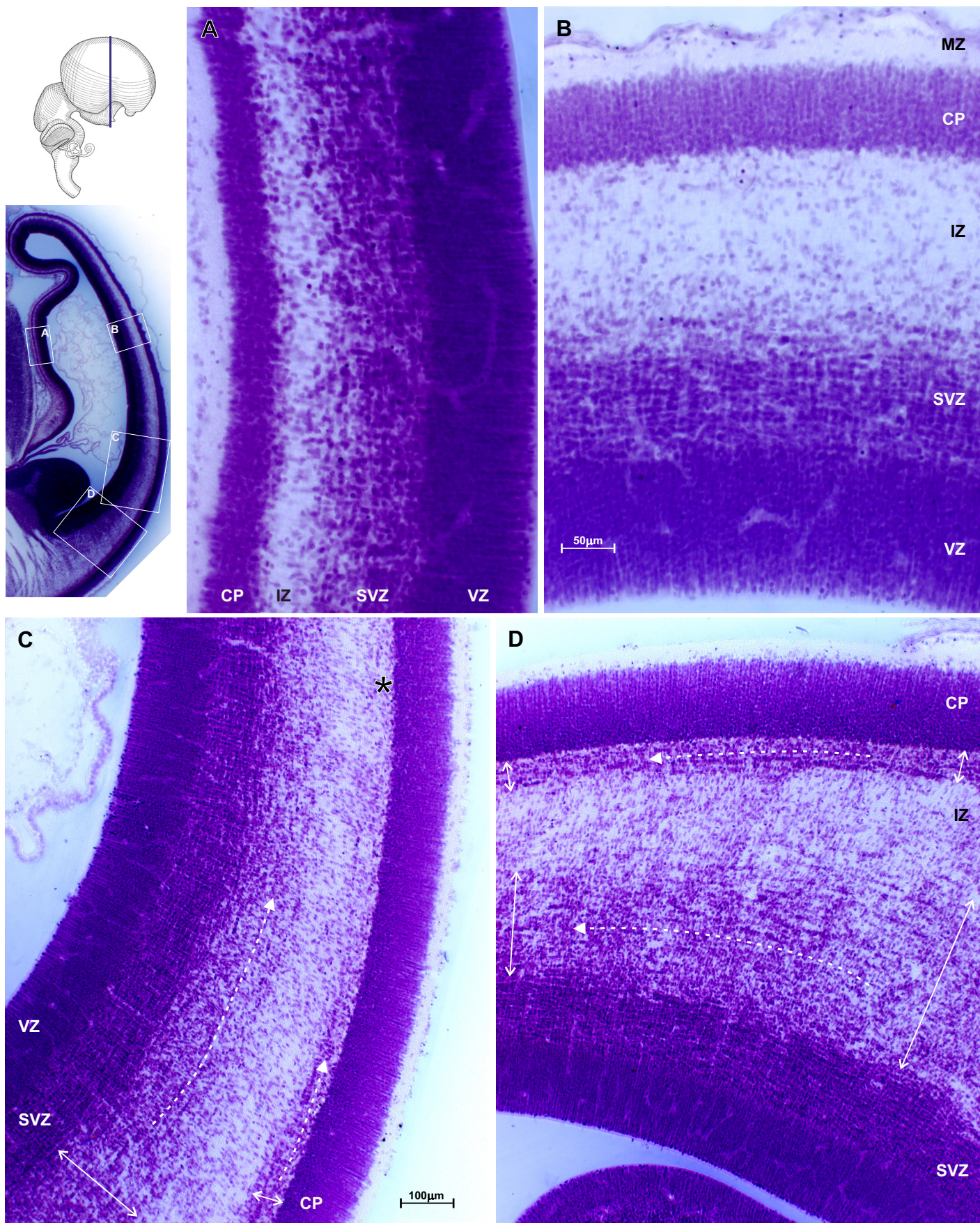
Na ventralnom dijelu lateralne stijenke palijuma prikazanom na panelu D (koji je zaokrenut za 160°) od ventralno prema dorzalno pojavljuju se dvije nove zone: jedna ispod kortikalne ploče, a druga iznad subventrikularne zone. Stanice u ove dvije zone nešto su rjeđe postavljene nego u kortikalnoj ploči i subventrikularnoj zoni. Zona iznad subventrikularne se kontinuirano stanjuje prema dorzalno, dok je u dijelu koji je najbliži ganglijskom brežuljku (D) šira od obiju proliferativnih zona zajedno (manja i veća dvostruka strelica). Zona ispod kortikalne ploče obuhvaća trećinu širine kortikalne ploče (manja i veća dvostruka strelica) te brzo nestaje (zvjezdica, C). Ova zona najvjerojatnije odgovara tangencijalno migrirajućim stanicama (isprekidana strelica) koje dolaze iz bazalnog dijela telencefalona. Zona iznad subventrikularne je u kontinuitetu sa zonom između ganglijskog brežuljka i strijatuma te predstavlja zonu tangencijalno migrirajućih stanica (isprekidana strelica) koje dolaze iz ganglijskog brežuljka. Ona se proteže nešto dalje u lateralnu stijenku, no ipak ne doseže do njezine sredine. U ovoj zoni uočavaju se i radijalno migrirajuće stanice koje su posebno gusto postavljene u ventralnom dijelu palijuma, na području gdje se stvaraju projekcijski neuroni koji odlaze prema cijeloj ventralnoj polovici palijuma te je stoga ova zona ovdje i posebno zadebljala.

**Slika 5.8** Fetus čovjeka star 10 tjedana, Golgi impregnirani rezovi.

Paneli A i B pokazuju presjek cijelom širinom zida lateralnog telencefalona u kojem dominiraju radijalno orijentirane migrirajuće i radijalno orijentirane stanice kortikalne ploče koje su završile migraciju. Najveći broj tangencijalno orijentiranih stanica nalazi se u subventrikularnoj zoni. Zanimljivo je da se veći broj stanica koje započinju diferencijaciju nalazi i dublje, u donjoj trećini intermedijalne zone (vrh strelice, B), a ne neposredno ispod kortikalne ploče.

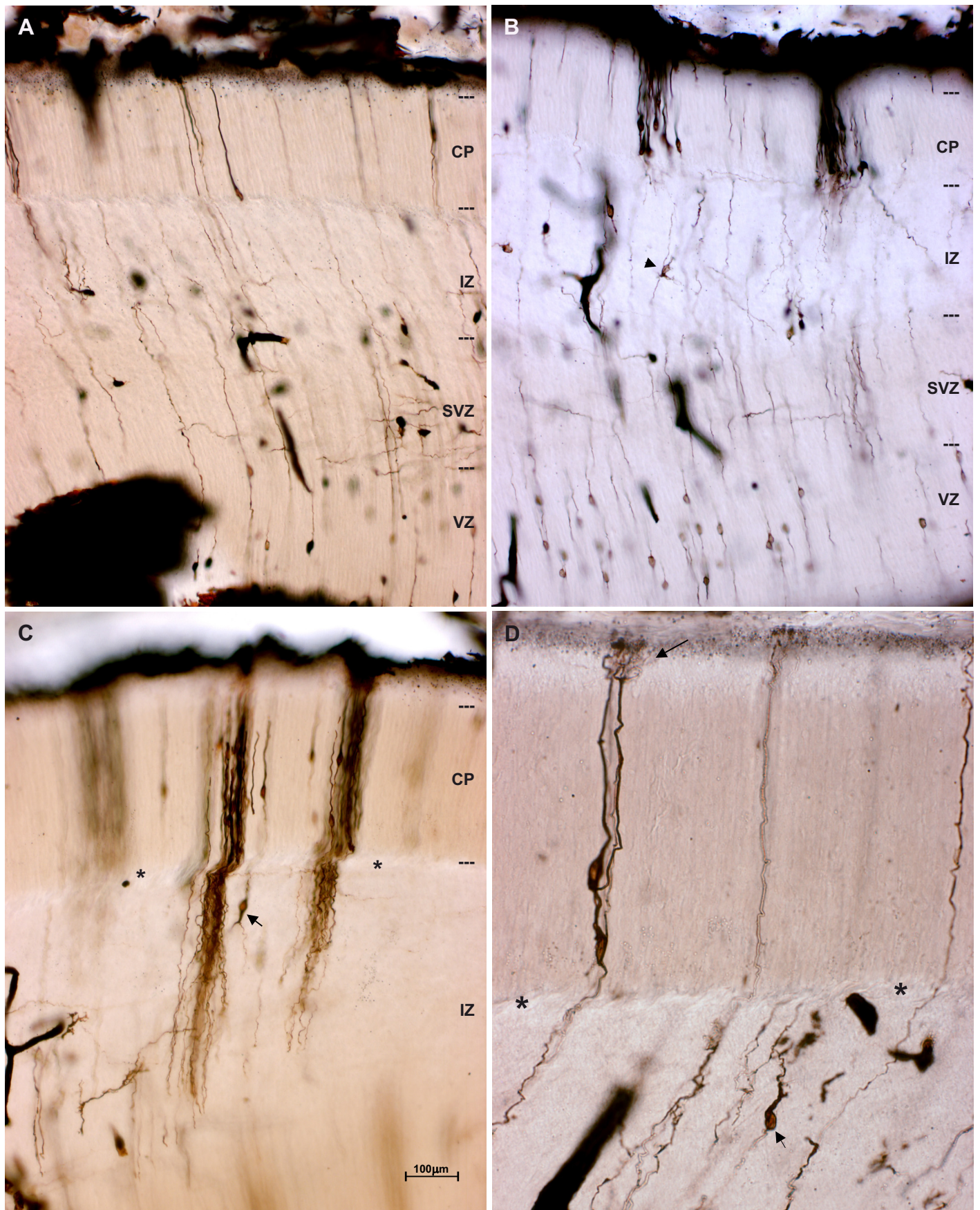
Ispod kortikalne ploče mogu se zapaziti stanice koje su se počele diferencirati, ali uglavnom nisu smještene neposredno ispod kortikalne ploče (vrh strelice, C i D).





**Slika 5.7** Fetus čovjeka star 9 tjedana, rezovi obojeni Nissl metodom. Paneli A-D prikazuju uvećane dijelove presjeka prikazanog na slici 5.6, a točne pozicije prikaza označene su pravokutnicima na umanjenom presjeku reza.





**Slika 5.8** Fetus čovjeka star 10 tjedana, Golgi impregnirani rezovi.

Neposredno ispod kortikalne ploče može se zapaziti tanak prozirni sloj (zvjezdica). U kortikalnoj ploči najdublje smještene stanice počinju se diferencirati i poprimaju obilježja tipičnih piramidnih neurona te se već u ovom razdoblju prepoznaje budući apikalni dendrit koji doseže do pije i razgranjuje se unutar marginalne zone (strelica).

**Slika 5.9** Fetus čovjeka star 9 tjedana, rezovi obojeni Nissl metodom. Paneli A-D prikazuju uvećane dijelove presjeka prikazanog na slici 5.6.

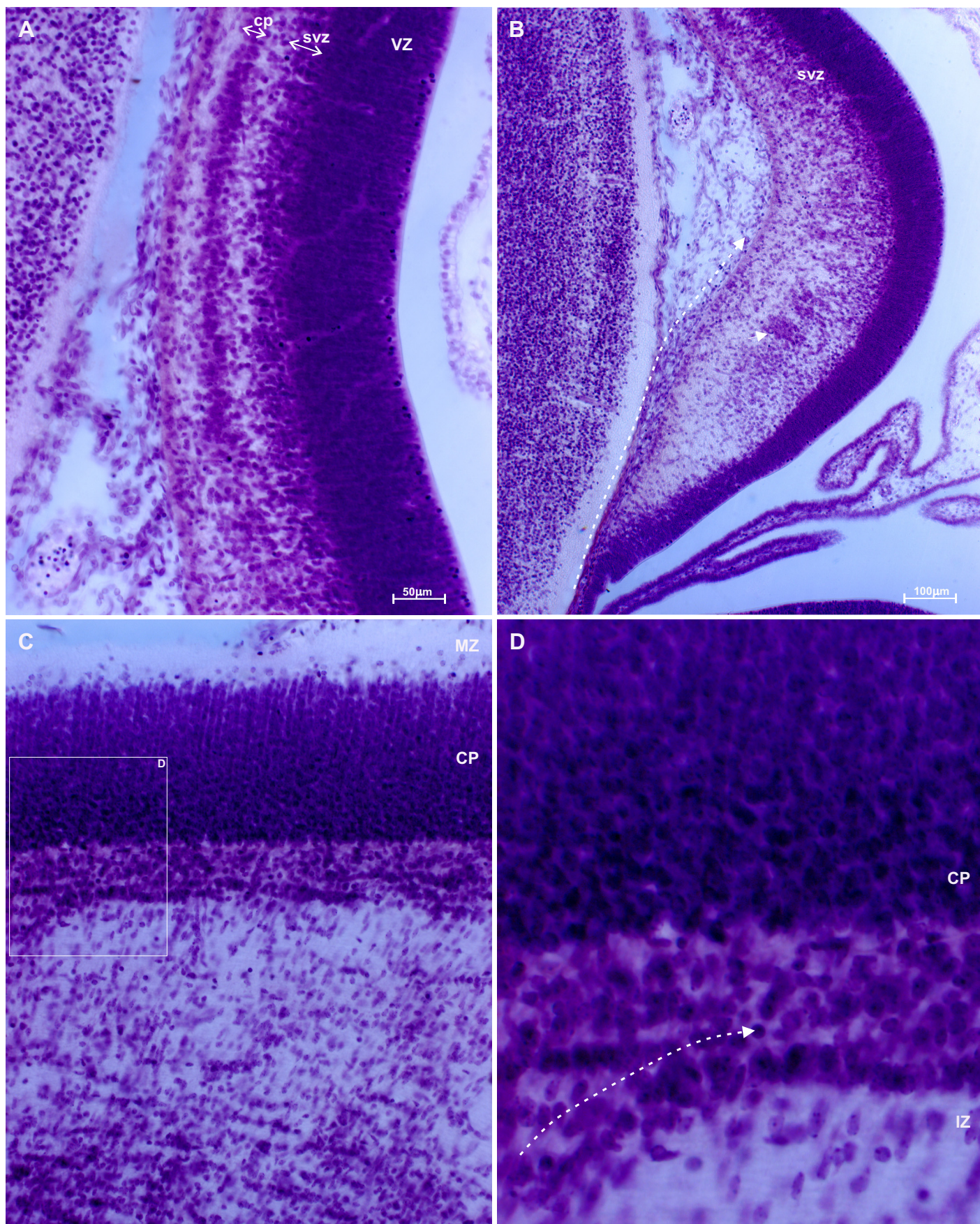
Paneli A i B prikazuju krajnje dijelove medijalnog telencefaličkog zida. U prijelaznom području gdje će se nalaziti budući mezokorteks (A) kortikalna ploča je sastavljena od 3-5 redova stanica. U ovom dijelu je i subventrikularna zona jako stanjena, 3-4 puta je tanja od ventrikularne, a zatim se u području budućeg hipokampusa (B) nastavlja u tanku zonu sporadično postavljenih subventrikularnih stanica. Prema arhikorteksu se iznad subventrikularne zone kroz srednju trećinu zida nalaze brojne difuzno raspoređene stanice koje u području hipokampusa formiraju otočiće gusto zbijenih stanica (strelica). U području arhikorteksa i hipokampusa jasno je vidljiv sloj subpijalno postavljenih stanica koji dolazi od proliferativne zone na granici prema koroidnom spletu (isprekidana strelica). Ovakav subpijalni podsloj nije prisutan u području neokorteksa (C).

Panel C odgovara ventralnom dijelu lateralnog zida palijuma, a pravokutnik je uvećano prikazan kao panel D. Zona ispod kortikalne ploče sadrži brojne, ali manje gusto poredane stanice u odnosu na kortikalnu ploču. Vidljivo je kako se u ventralnom dijelu (lijevo na panelu) pridružuju stanice (isprekidana strelica) te kako većina stanica u ovoj zoni nema radijalnu orijentaciju za razliku od stanica u intermedijalnoj zoni.

**Slika 5.10** Fetus čovjeka star 9 tjedana, rezovi obojeni Nissl metodom. Paneli B-D uvećani su dijelovi označeni pravokutnikom na panelu A.

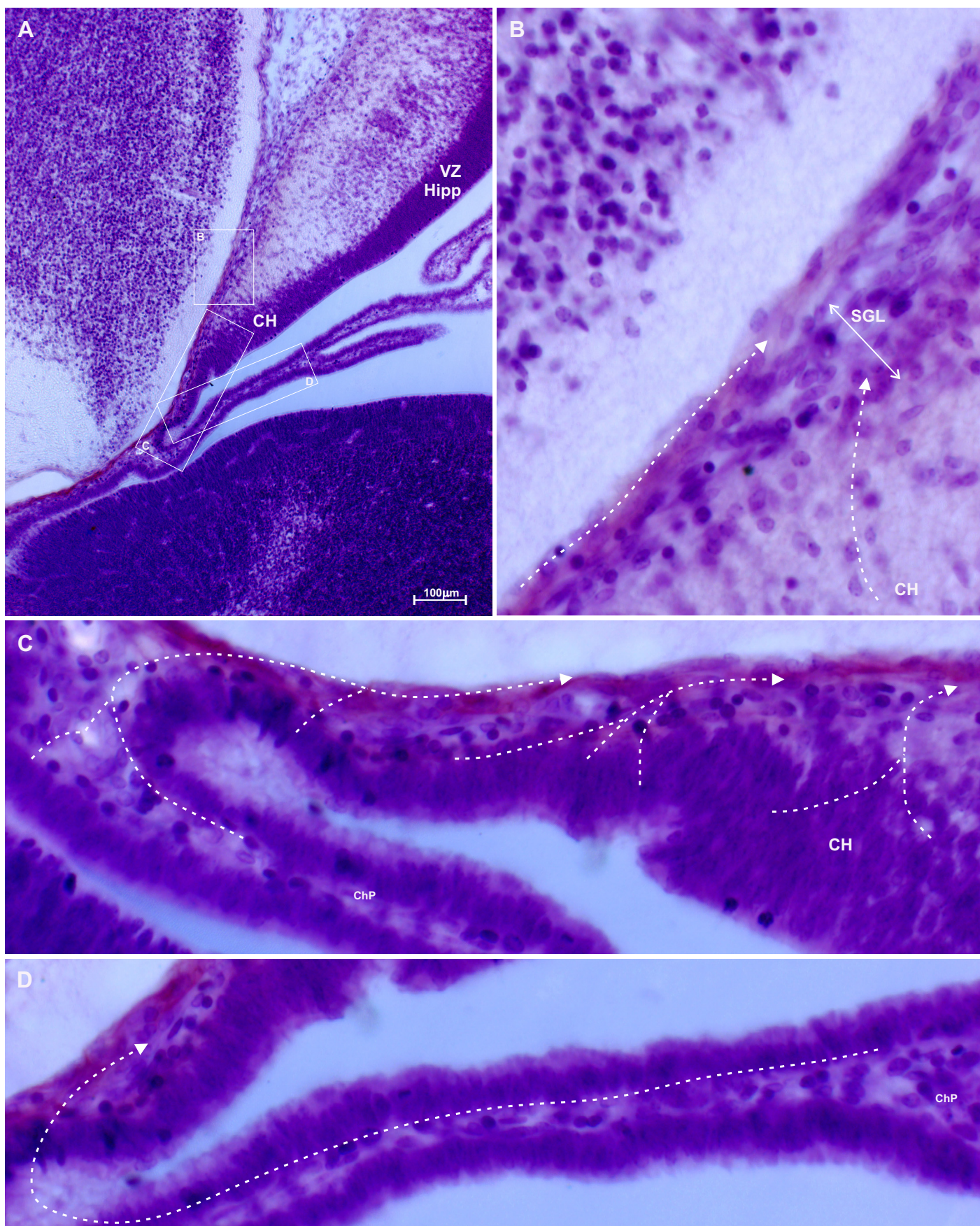
Panel A prikazuje najudaljeniji dio medijalnog telencefaličkog zida i koroidni splet te je vidljivo formiranje subpijalnog sloja stanica koje je uvećano prikazano na panelu B. Isprekidane strelice prikazuju da se subpijalni sloj formira od stanica proliferativne zone koja se nastavlja na hipokampalnu i odgovara kortikalnom hemu, spojne zone prema koroidnom spletu (C), ali i iz samog koroidnog spleta (D).





**Slika 5.9** Fetus čovjeka star 9 tjedana, rezovi obojeni Nissl metodom. Paneli A-D prikazuju uvećane dijelove presjeka prikazanog na slici 5.6.





**Slika 5.10** Fetus čovjeka star 9 tjedana, rezovi obojeni Nissl metodom. Paneli B-D uvećani su dijelovi označeni pravokutnikom na panelu A.

**Slika 5.11** Fetus čovjeka star 10 tjedana, Golgi impregnirani rezovi dodatno obojeni Nissl metodom.

Presjek prolazi kroz rostralni dio telencefalona te kroz područje septuma i paleokortikalnog ventrikula, a zahvaća i dio olfaktornog bulbusa. Na panelu A vidi se da su kaudatus i putamen razdvojeni vlaknima kapsule interne te da se iz proliferativne zone na prijelazu ganglijskog brežuljka u septalnu proliferativnu zonu (vrh paleokortikalnog ventrikula) odvajaju stanice koje se usmjeravaju prema bazalno (isprekidana strelica). Pravokutnik označen na panelu A uvećano je prikazan kao panel C te pokazuje masu stanica kako se nagomilava na bazalnoj površini, više prema septalno (deblja isprekidana strelica). Panel B prikazuje uvećani dio medijalnog zida i stanice koje se s mjesta pregiba arhikortikalne zone prema koroidnom spletu usmjeravaju subpijalno (isprekidana strelica). Ovi podaci pokazuju da su proliferativne zone paleokortikalnog ventrikula i prijelaznih zona prema koroidnom spletu glavni izvor stanica koje u ovom stadiju ulaze u marginalnu zonu.

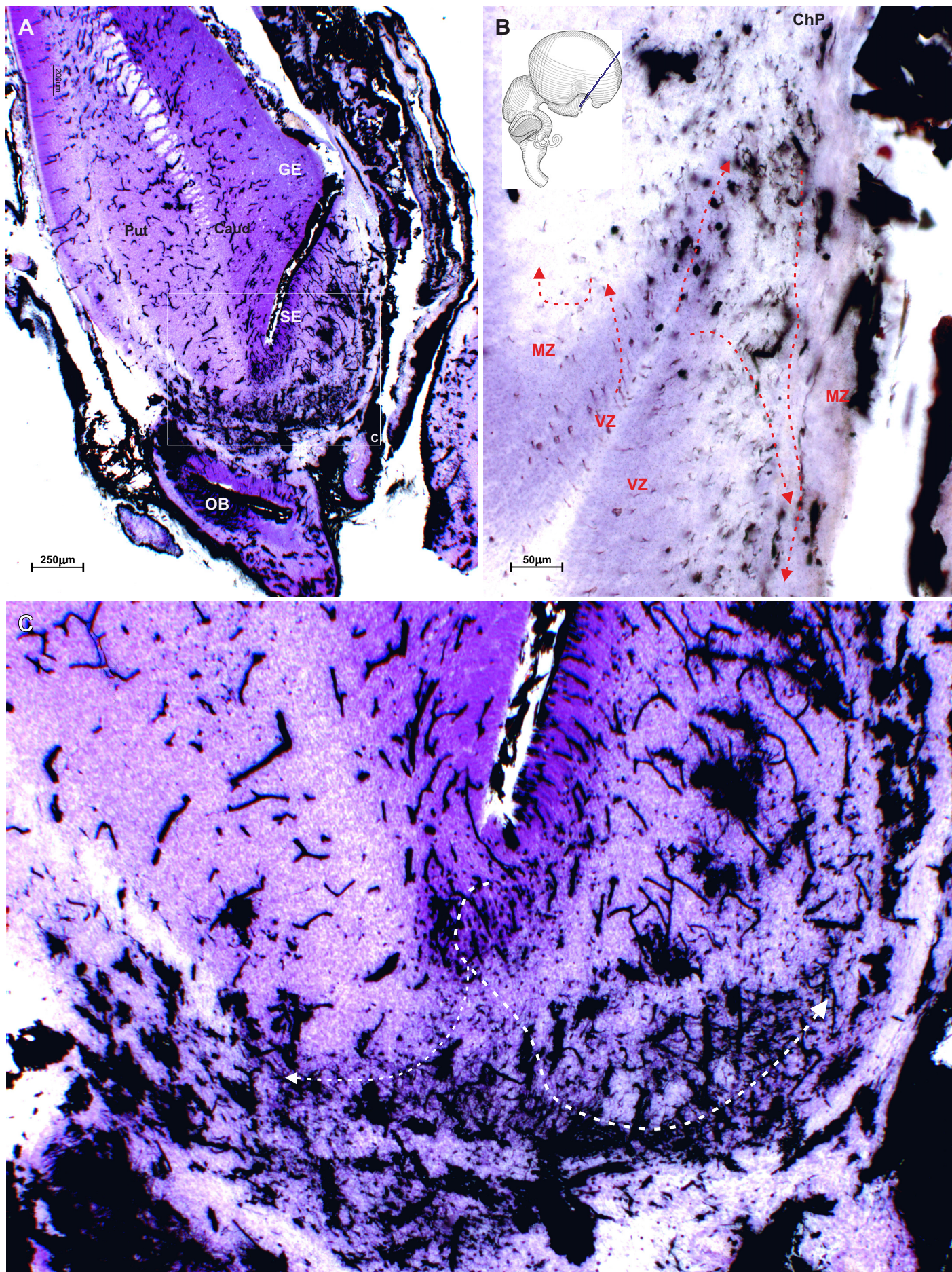
**Slika 5.12** Fetus čovjeka star 10 tjedana, Golgi impregnirani rezovi dodatno obojeni Nissl metodom. Pravokutnik označen na panelu A uvećano je prikazan kao panel B, a pravokutnik označen na panelu B uvećano je prikazan kao panel C.

Presjek prolazi kroz kaudalni dio telencefalona na mjestu gdje se počinju spajati ventralni i dorzalni hipokampus. Vidljivo je kako na prijelazu stanjenog dijela medijalnog telencefaličkog zida (koji čini osnovu forniksa) prema proliferativnoj zoni dorzalnog arhikorteksa odlazi masa stanica i formira subpijalno smješten sloj gusto postavljenih stanica koji se nalazi u dorzalnog dijelu medijalnog telencefaličkog zida (isprekidane strelice). Ovi podaci pokazuju kako je proliferativna zona koja se nalazi ispod osnove forniksa u ovom razdoblju važan izvor stanica koje rade invaziju marginalne zone telencefalona.

**Slika 5.13** Fetus čovjeka star 10 tjedana, Golgi impregnirani rezovi dodatno obojeni Nissl metodom. Pravokutnik označen na panelu A uvećano je prikazan kao panel B.

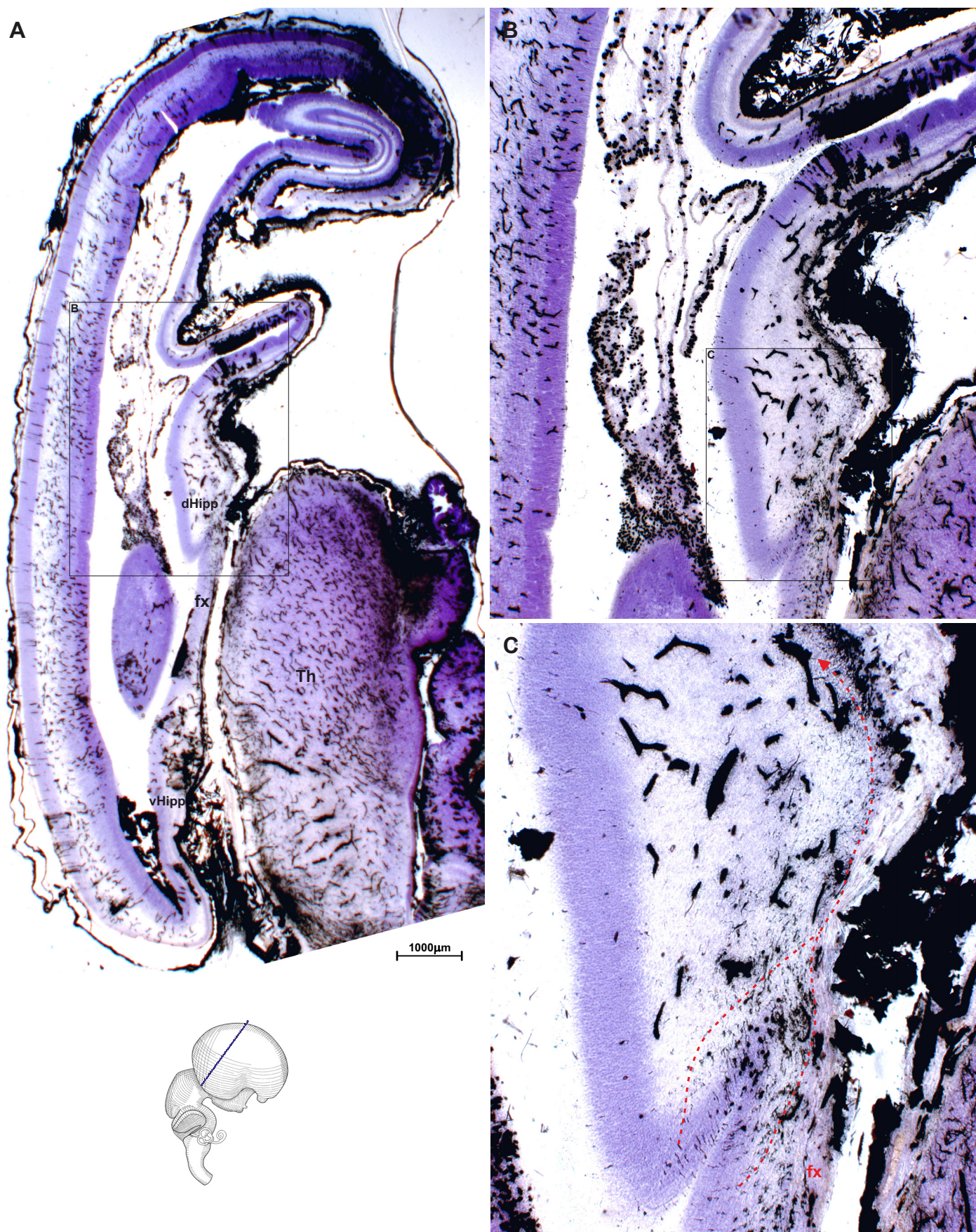
Presjek malo kaudalnije od presjeka na slici 5.10 koji prolazi kroz kaudalni dio telencefalona na mjestu gdje se spajaju ventralni i dorzalni hipokampus. Cijelom dužinom medijalnog telencefaličkog zida (A) subpijalno se nalaze stanice koje migriraju prema ventralno i dorzalno (isprekidana strelica, B). Ove stanice su tangencijalno orijentirane i čine sloj debljine 3-5 redova (dvostruka strelica). Debljina ovog podsloja veća je u dorzalnog dijelu što ukazuje kako se te stanice stvaraju u ograničenom području medijalnog telencefaličkog zida.





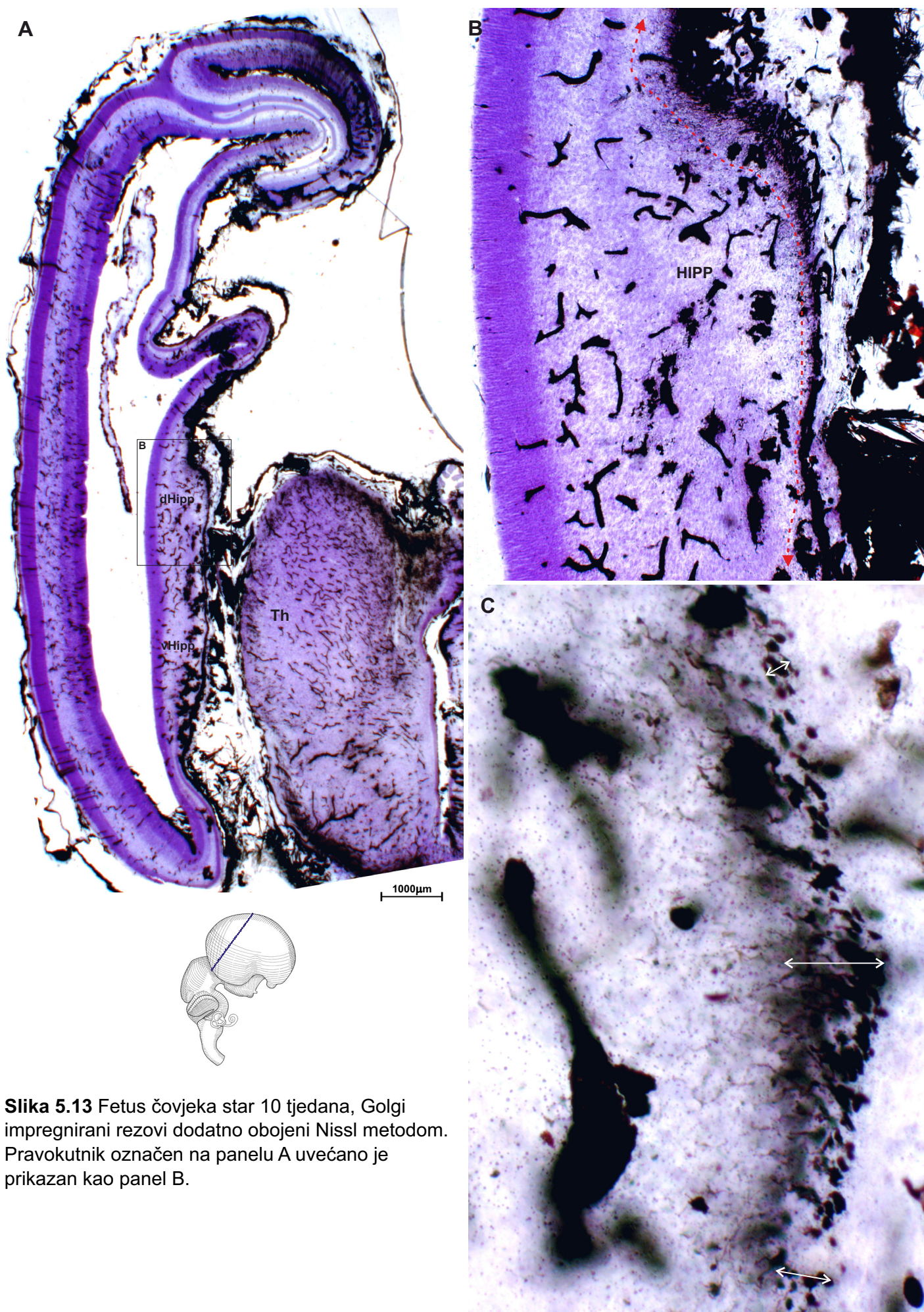
**Slika 5.11** Fetus čovjeka star 10 tjedana, Golgi impregnirani rezovi dodatno obojeni Nissl metodom.





**Slika 5.12** Fetus čovjeka star 10 tjedana, Golgi impregnirani rezovi dodatno obojeni Nissl metodom. Pravokutnik označen na panelu A uvećano je prikazan kao panel B, a pravokutnik označen na panelu B uvećano je prikazan kao panel C.





**Slika 5.13** Fetus čovjeka star 10 tjedana, Golgi impregnirani rezovi dodatno obojeni Nissl metodom. Pravokutnik označen na panelu A uvećano je prikazan kao panel B.

### **5.1.2 Tangencijalna migracija u majmuna između 46. i 48. embrionalnog dana**

U razdoblju E44-E50 analizirani su rezovi tkiva mozga dva majmuna u dobi E46 i E48, obojeni Nissl metodom te obrađeni imunohistokemijskim metodama (slika 5.14).

#### **5.1.2.1 Laminarna organizacija telencefalona i zone stvaranja tangencijalno migrirajućih stanica**

Telencefalon se na presjecima majmunskeg tkiva mozga u dobi E46-48 obojenih Nissl metodom (slika 5.15-5.20) može podijeliti u tri glavna dijela: 1) bazalni, 2) latero-dorzalni i 3) medijalni dio.

U bazalnom dijelu telencefalona dominira ganglijski brežuljak koji predstavlja snažno zadebljanje proliferativnih zona. Ventralno od ganglijskog brežuljka nalaze se jasno prepoznatljivi dijelovi strijatuma, kaudatus i putamen, koji se tek mjestimično počinju razdvajati vlaknima koja urastaju iz talamusa. Ova su vlakna usmjerena prvenstveno prema ventro-lateralnim dijelovima telencefalona. U bazalnom dijelu telencefalona nema kortikalne ploče, već je područje od urastajućih vlakana prema pijalnoj površini ispunjeno stanicama koje su nešto manje gusto zbijene u odnosu na kortikalnu ploču. Intenzitet bojenja ovog područja odgovara intenzitetu subventrikularne zone. Ove nakupine stanica su mjestimično i gušće poredane te odgovaraju amigdalama i jezgrama bazalnog telencefalona. Ova nakupina stanica u kontinuitetu je s hipotalamusom, a rostralno se nastavlja u medijalni zid septalnog područja. Proliferativne zone u rostralnom dijelu jasno se mogu podijeliti na lateralni i medijalni ganglijski brežuljak, koji je ventralno u kontinuitetu s preoptičkom proliferativnom zonom. U području samog ganglijskog brežuljka primjetne su tri zone (slika 5.15B). Ventrikularna zona je relativno konstantne debljine koja odgovara onoj u najventralnijim dijelovima lateralnog zida. Druga je subventrikularna zona, za koju je zanimljivo da u odnosu na lateralnu stijenu nije tako jasno razgraničena od ventrikularne. Također, subventrikularna zona nije ravnomjerne debljine u svim dijelovima te se na nekim presjecima u području spoja između medijalnog i lateralnog ganglijskog brežuljka uopće ne može razaznati. Isti je slučaj na području prijelaza lateralnog dijela ganglijskog brežuljka u dorzalne proliferativne zone. Također, i u preoptičkom području nalazi se jedinstvena proliferativna zona. Treći sloj koji se nalazi u ganglijskom brežuljku proteže se od gornjeg ruba subventrikularne zone, a lateralno do rubova strijatuma. On pokriva i medijalne dijelove proliferativne zone preoptičkog područja. Ovaj sloj je svjetlije obojan od proliferativnih zona, a ima i drukčiju nijansu bojenja od strijatuma. Moguće je da ova zona predstavlja zonu migracije stanica koje se stvaraju u ganglijskom brežuljku (Hansen i sur., 2013, Ma i sur., 2013). Proliferativna zona preoptičkog područja se u najventralnijem dijelu stanjuje te zatim u



medijalnom telencefaličkom zidu prelazi u proliferativnu zonu septalnog područja. Čini se da samo na jednom uskom dijelu postoji kontinuitet preoptičkog i septalnog područja te da proliferativna zona u području vrha paleokortikalnog ventrikula ima posebna svojstva (slika 5.18C). Ovaj dio proliferativne zone u jasnom je kontinuitetu s olfaktornim proliferativnim epitelom.

Lateralni i dorzalni dijelovi telencefalona obilježeni su tipičnom ranom fetalnom laminacijom te se jasno mogu prepoznati ventrikularna, subventrikularna i intermedijalna zona, kortikalna ploča i najpovršnije smještena marginalna zona. Kortikalna ploča najdeblja je u bazo-lateralnom dijelu, gdje se može vidjeti 10 do 15 redova stanica (slika 5.17). U ovom razdoblju, debljina kortikalne ploče iznosi oko 40% debljine ventrikularne zone. Kortikalna ploča prisutna je i u dorzalnom dijelu medijalnog telencefaličkog zida, a u najrostralnijem (budući frontalni režanj) i najkaudalnijem dijelu (okcipitalni režanj) cjelokupan medijalni zid ima razvijenu kortikalnu ploču (slika 5.18). U ovim dijelovima debljina kortikalne ploče sadrži 1 do 3 reda stanica te se na temelju Nissl bojenja ne može zaključiti radi li se možda o pred-ploči. U medijalnim dijelovima telencefaličkog zida subventrikularna zona ne može se definirati, dok se u lateralnim dijelovima jasno razaznaje granica prema ventrikularnoj i intermedijalnoj zoni. Subventrikularna zona u ventro-lateralnim dijelovima jednako je debela ili debljinom čak i premašuje ventrikularnu zonu. No, manji intenzitet bojenja ukazuje i na manje gust raspored stanica u odnosu na ventrikularnu zonu.

Prilikom opisivanja medijalnog telencefaličkog zida treba napomenuti kako najrostralniji, najkaudalniji i najdorzalniji dijelovi laminarnom organizacijom predstavljaju ekstenziju dorzo-lateralnog telencefaličkog zida te se daljnji opis medijalnog telencefaličkog zida ne odnosi na ove dijelove (slike 5.17-5.20). Najventralniji dijelovi medijalnog telencefaličkog zida predstavljaju kontinuitet s bazalnim telencefalonom (slika 5.17D). Ova nakupina stanica najvećim dijelom predstavlja preteču subkortikalnih struktura koje čine kontinuitet bazalnog i septalnog dijela telencefalona. Na Nissl rezovima nije moguće razgraničiti pojedine jezgre, osim tamnijeg obojenja koje je posljedica zgusnuća neurona u pojedinim dijelovima amigdaloidnog kompleksa. Na većem povećanju primjetno je da brojne stanice u ovom području imaju oblik migratornih stanica te se stvara dojam kako je ovo područje i važan migratorni put (slika 5.18A i 5.20). Proliferativna zona septalnog područja u kontinuitetu je s proliferativnom zonom preoptičkog područja (slika 5.15 i 5.18), iako je taj kontinuitet jasno prisutan samo u jednom uskom području. U većini ostalih rezova proliferativna zona koja oblaže vrh paleokortikalnog ventrikula ima drukčija obilježja te je u kontinuitetu s proliferativnim zonama olfaktornog neuroepitela. Ventrikularna zona septalnog područja progresivno se stanjuje od ventralno prema dorzalno (slika 5.18). U ventralnoj polovici septalnog dijela iznad ventrikularne zone nalazi se sloj manje gusto poredanih stanica, no na temelju Nissl bojenja nije moguće utvrditi radi li se o proliferativnoj

subventrikularnoj zoni, migratornom putu ili nakupljanju stanica koje će oblikovati subkortikalne jezgre septalnog područja. U dorzalnog dijelu medijalnog telencefaličkog zida kortikalna ploča stanjuje se prema ventralno na jedan sloj stanica, nakon čega se više ne razaznaje (slika 5.17). Završetak kortikalne ploče predstavlja granicu budućeg neokorteksa. U ovom dijelu ventrikularna zona je dobro razvijena, ali subventrikularnu zonu nije moguće jasno razaznati. Na nekim razinama nema jasno prisutne kortikalne ploče u dorzo-medijalnim dijelovima telencefalona. Ventrikularna zona se progresivno stanjuje i u području hipokampalne pukotine iznosi polovicu debljine koju je imala u najdorzalnijem dijelu (slika 5.18C). U rostralnim dijelovima hipokampalne pukotine nema grupiranja neurona u obliku kortikalne ploče, no u kaudalnim dijelovima nalaze se otočići neurona koji se grupiraju ispod tanke zone bez stanica koja ih odvaja od pije (slika 5.19B). U području hipokampalne pukotine udaljenost od ventrikularne zone do pije dva puta je veća od debljine ventrikularne zone. Hipokampalna ventrikularna zona dodatno se stanji prije nego se pretvori u epitel koroidnog spleta. Epitel koroidnog spleta u početnom dijelu u kojemu se nastavlja iz proliferativnih zona pokazuje intenzivnije bojenje te se između epitelnih površina mogu primijetiti stanice nalik migratornim sa nastavcima usmjerenim prema telencefaličkom zidu. Također, iz fokalnog područja završnog dijela ventrikularne zone vidi se lanac stanica koje su usmjerene subpialno. Iz pojedinih točaka hipokampalne zone stanice u lancu usmjerene su prema pialnoj površini, a isto je vidljivo i u susjednim arhikortikalnim dijelovima (slika 5.19).

Rezovi majmunskog mozga u stadiju E48 obrađeni su imunohistokemijskim metodama za otkrivanje transkripcijskog faktora Mash1 (Asch1 ili Hasch1) koji se tijekom fetalnog razdoblja nalazi u proliferativnim stanicama (slika 5.21 – 5.23). Razina ekspresije Mash1 se povećava u dijelu proliferativnih stanica koje započinju s neurogenezom, a u proencefalonu se to odnosi na proliferativne stanice koje će producirati GABA-ergičke neurone. Zbog toga je ekspresija Mash1 prisutna u proliferativnim stanicama bazalnog telencefalona, kao i u ventralnim dijelovima proliferativnih zona različitih dijelova diencefalona (slika 5.21-5.23).

U stadiju E48 najjača Mash1 aktivnost prisutna je u proliferativnim zonama bazalnog telencefalona: ganglijskom brežuljku, septalnom proliferativnom području i u preoptičkom području (slika 5.22). Aktivnost u proliferativnoj zoni preoptičkog područja nastavlja se u intenzivnu Mash1 reaktivnost koju nalazimo u ventralnom dijelu hipotalamičkih proliferativnih zona. Također, proliferativna zona hipotalamusa kao i ventralni dio proliferativne zone talamusa pokazuju intenzivnu Mash1 reaktivnost. Mash1 reaktivnost prisutna je i u dijelovima proliferativnih zona palijuma (slika 5.21). U dijelovima neopalijuma Mash1 reaktivnost prisutna je u stanicama subventrikularne zone. U područjima gdje je subventrikularna zona u nastajanju, reaktivnost je najintenzivnija i većina stanica pokazuje intenzivnu Mash1 reaktivnost. Zbog toga je reaktivnost najintenzivnija u ventralnom i posebno dorzalnog dijelu

telencefalona, dok je u lateralnim dijelovima nema. U područjima gdje je najintenzivnija reaktivnost u subventrikularnoj zoni, intenzivno reaktivne stanice formiraju red uz samu ventrikularnu površinu, a razbacane stanice s migratornom morfologijom prisutne su kroz ventrikularnu zonu. Oblik i smještaj Mash1 pozitivnih stanica u proliferativnim zonama palijuma ukazuje da se one stvaraju uz samu ventrikularnu površinu te migriraju iznad ventrikularne zone gdje oblikuju subventrikularnu zonu. Paralelno sa zadebljanjem subventrikularne zone smanjuje se broj Mash1 pozitivnih stanica te ih više nema na mjestima gdje se subventrikularna zona debljinom približava ventrikularnoj. Ovdje treba spomenuti kako u stadiju E55 nema zabilježene Mash1 reaktivnosti u palijumu, izuzev migracije progenitora u području budućeg girus dentatusa. Stoga je Mash1 reaktivnost u proliferativnim zonama neopalijuma tijekom ranog postembrionalnog razdoblja prolazna.

U arhipalijumu je vidljiva puno blaža reaktivnost, kao i manja gustoća Mash1 pozitivnih stanica u ventrikularnoj zoni, ali je ipak moguće u većem dijelu arhipalijuma identificirati 2 do 3 reda debeli sloj slabo reaktivnih Mash1 stanica iznad ventrikularne zone. Zanimljivo je kako na prijelazu arhikorteksa u neokorteks postoji veće nakupljanje srednje reaktivnih stanica u subventrikularnoj zoni (slika 5.21 C-E). Također, u području hipokampusu i spojnog dijela prema koroidnom spletu može se uočiti sloj srednje jako reaktivnih Mash1 stanica, ali nema pokazatelja migracije progenitora budućeg girus dentatusa (slika 5.21C i slika 5.23A).

Stanice telencefalona koje napuštaju proliferativne zone, uključujući i one koje napuštaju bazalne proliferativne zone gube Mash1 reaktivnost, tako da su uz rubna područja proliferativnih zona vidljive sporadično slabo reaktivne stanice.

U rostralnom dijelu, odmah ispred dorzalnog hipokampusu u području stvaranja komisuralne ploče na jednom lokaliziranom području većina stanica ventrikularne zone pokazuje visoku Mash1 reaktivnost (slika 5.22A). Na medijalnom telencefaličkom zidu Mash1 reaktivnost prisutna je u proliferativnoj zoni septalnog područja (slika 5.22C). Najdublje smješten dio proliferativne zone, 20-30 $\mu$ m uza samu klijetku, sadrži izrazito gusto poredane intenzivno reaktivne Mash1 pozitivne stanice, dok je ostalih 100 $\mu$ m manje intenzivno reaktivno. I u ganglijskom brežuljku i u preoptičkom području vidljiv je ovaj intenzivno reaktivan sloj uz samu ventrikularnu površinu, ali je u ganglijskom brežuljku sloj iznad nejednake debljine i daleko deblji nego u septalnom dijelu. U preoptičkom području proliferativna zona je jednolike debljine, ali za razliku od septalnog područja iznad ovog sloja prisutan je još jedan sloj, subventrikularni sloj koji je izgrađen slično kao i ventrikularna zona (tanji sloj gusto poredanih stanica i iznad njega deblji s manjom reaktivnošću). Između subventrikularne zone preoptičkog područja i ganglijskog brežuljka s jedne strane i strijatuma s druge strane nalazi se zona s rjeđe poredanim i manje reaktivnim stanicama. Ova zona

odgovara manje intenzivno obojenoj zoni vidljivoj i na Nissl obojenim preparatima. Zanimljivo je kako nema kontinuiteta između proliferativnih zona ganglijskog brežuljka i septuma.

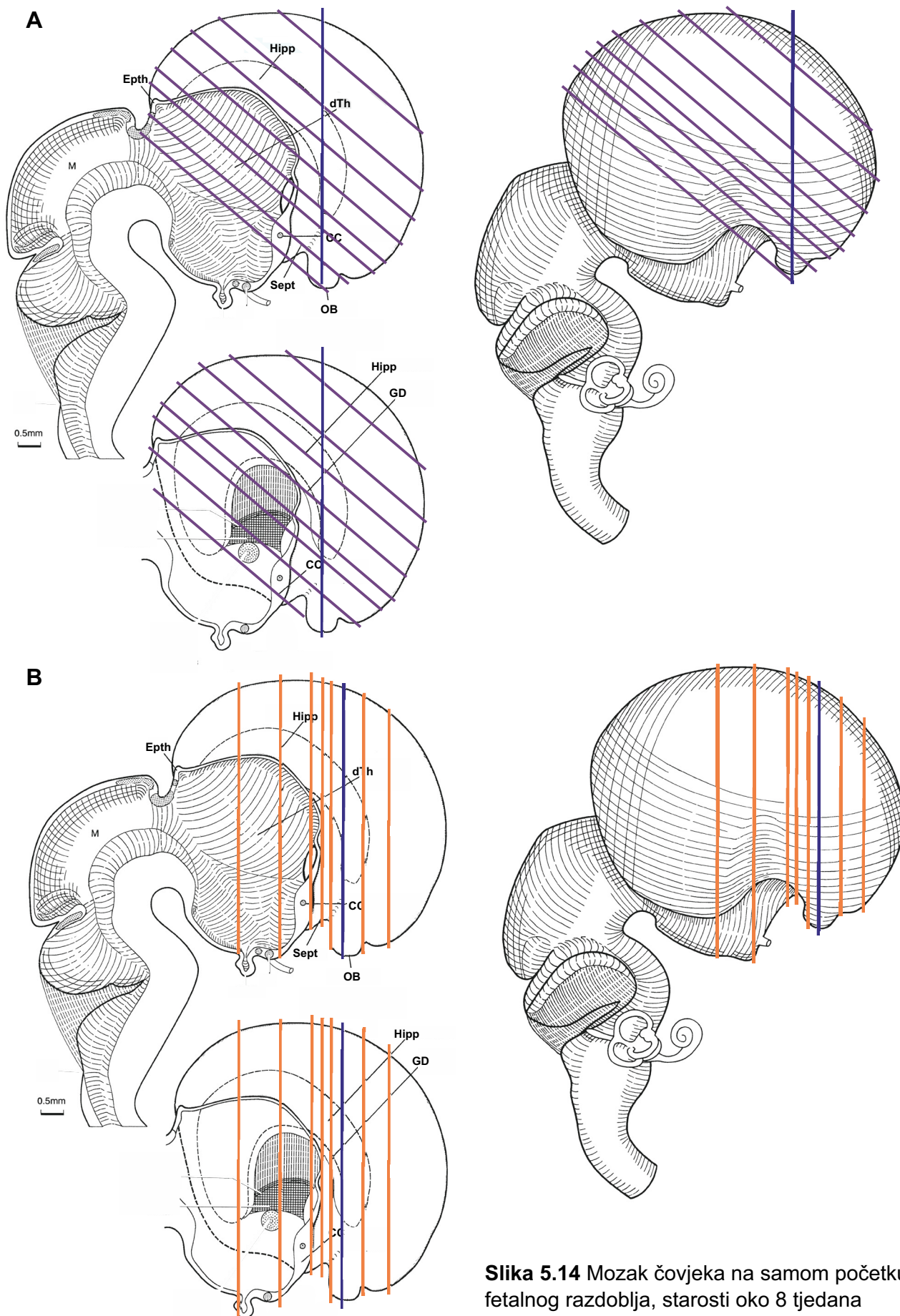
Mash1 reaktivnost pokazuje kako se proliferativne zone preoptičkog područja nastavljaju u hipotalamičke proliferativne zone (slika 5.22D). Mash1 reaktivna hipotalamička proliferativna zona zahvaća najveći dio proliferativne zone talamusa i uz tanki visoko reaktivni 20-30µm debeli dio uz samu klijetku sadrži i jasno izraženu subventrikularnu zonu koja je na nekim dijelovima jako proširena. Za razliku od toga, Mash1 intenzivno reaktivni dio talamičke proliferativne zone obuhvaća samo manji ventralni dio i ne sadrži subventrikularni sloj (slika 5.23). U epitalamusu nije zapažen Mash1 intenzivno reaktivni dio u proliferativnoj zoni, iako ventralni dio pokazuje nešto veću reaktivnost od dorzalnog. Treba spomenuti kako je slaba Mash1 reaktivnost prisutna u nekim stanicama kroz cjelokupnu diencefaličku proliferativnu zonu.



## Deskriptivna analiza Nissl i Mash1 rezova

**Slika 5.14** Mozak čovjeka na samom početku fetalnog razdoblja, starosti oko 8 tjedana (CRL 42mm) (modificirano prema O'Rahilly i Müller, 2006).

Na slici je prikazan mozak čovjeka na samom početku fetalnog razdoblja, starosti oko 8 tjedana (CRL 42mm). Na panelu A prikazane su razine rezova obrađenih Nissl metodom (plavo), a na panelu B razine rezova imunohistokemijski obrađenih na Mash1 (narančasto) kod majmuna u razdoblju E46-E48. Treba obratiti pažnju da su ravnine rezova postavljene pod kutom od 60°. Donji medijalni presjek prikazan je da se kroz proziran prozencefalon vide hipokampus, područje dentatusa, area epitelialis i koroidna fisura.

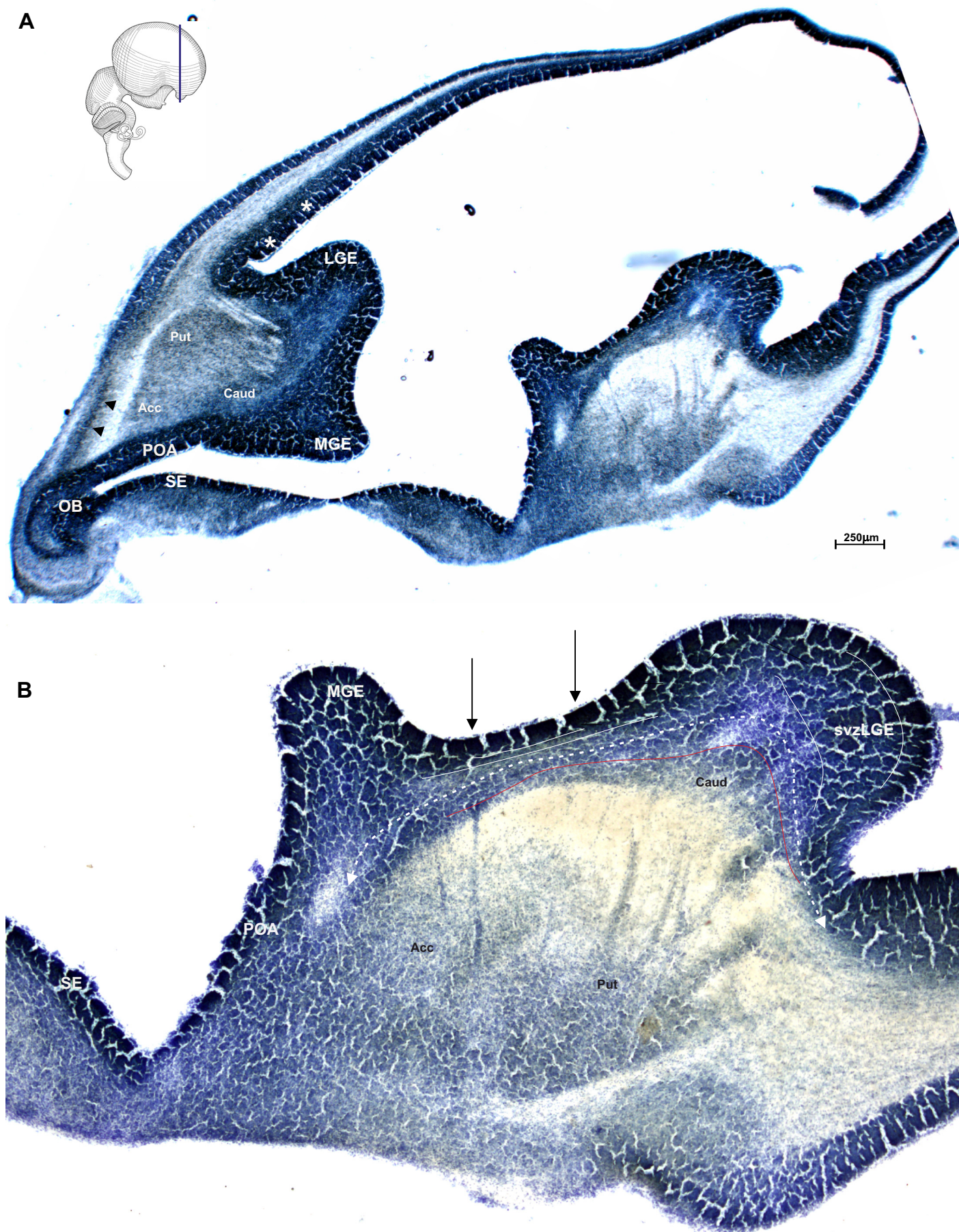


**Slika 5.14** Mozak čovjeka na samom početku fetalnog razdoblja, starosti oko 8 tjedana (CRL 42mm) (modificirano prema O'Rahilly i Muller 2006).

**Slika 5.15** Majmun E48, rezovi obojeni Nissl metodom. Pravokutnik označen na panelu A uvećano je prikazan kao panel B.

Presjek prolazi kroz najrostralniji dio telencefalona te se bazalno vidi spoj između lijevog i desnog telencefaličkog mjehurića. Ovaj bazalni spoj predstavlja dorzalnu ekstenziju septalnog područja koje se u najlateralnijem bazalnom dijelu nastavlja u olfaktorni proliferativni epitel. Proliferativna zona se zatim nastavlja od ventralno prema dorzalno u proliferativne zone preoptičkog područja, medijalnog i lateralnog ganglijskog brežuljka, a zatim u kortikalne proliferativne zone palijuma (dorzalnog telencefalona). U palijumu se, i u lateralnom i u dorzalnom dijelu, mogu uočiti ventrikularna i subventrikularna zona koje se progresivno stanjuju od ventralno prema dorzalno. U najventralnijem dijelu palijuma subventrikularna zona debljinom prelazi ventrikularnu zonu (zvjezdice). U lateralnoj stijenci telencefalona mogu se jasno uočiti sve zone koje nalazimo u ranom fetalnom razdoblju: marginalna zona, kortikalna ploča, intermedijalna zona i proliferativne zone. U dorzalnom dijelu kortikalna ploča se ne može jasno uočiti. U bazolateralnom dijelu nema kortikalne ploče te se nešto ispod pijalne površine može uočiti 100-200 $\mu$ m debeli tračak (vrh strelice) koji se proteže od olfaktornog proliferativnog epitela i najvjerojatnije predstavlja osnovu klaustruma, iznad kojega se nalazi osnova korteksa inzule. Na ovoj su razini bazalni gangliji većinom spojeni, iako u njih počinju urastati vlakna te se može razaznati osnova kaudatusa, putamena i akumbensa. Proliferativne zone bazalnog telencefalona (ganglijski brežuljak i preoptičko područje) karakterizira ventrikularna zona koja je relativno konstantne debljine (150-200 $\mu$ m), dok debljina subventrikularne zone pokazuje veliku varijabilnost (B). U području preoptičke proliferativne zone na Nissl preparatima nije moguće jasno razgraničiti ventrikularnu od subventrikularne zone, tako da se čini da ovdje postoji samo ventrikularna zona. Zanimljivo je i kako na spoju medijalnog i lateralnog ganglijskog brežuljka subventrikularna zona gotovo nestaje, što je posebno izraženo na desnoj strani telencefalona gdje je presjek nešto rostralniji u odnosu na lijevu stranu (strelice, B). Bijele linije označavaju granicu subventrikularne zone, a crvena granicu prema bazalnim ganglijima. Između subventrikularne zone ganglijskog brežuljka i preoptičkog područja s jedne strane te ventralnih, medijalnih i dorzalnih dijelova strijatuma nalazi se zona sa svjetlijim stanicama koja zauzima približno jednaku površinu kao i subventrikularna zona (isprekidana strelica). Moguće je da ova zona predstavlja zonu migracije stanica koje se stvaraju u ganglijskom brežuljku (Hansen i sur., 2013, Ma i sur., 2013).





**Slika 5.15** Majmun E48, rezovi obojeni Nissl metodom. Pravokutnik označen na panelu A uvećano je prikazan kao panel B.

**Slika 5.16** Majmun E48, rezovi obojeni Nissl metodom. Paneli A-C prikazuju uvećane dijelove presjeka prikazanog na slici 5.15A, a točne pozicije prikaza označene su pravokutnicima na umanjenom presjeku reza.

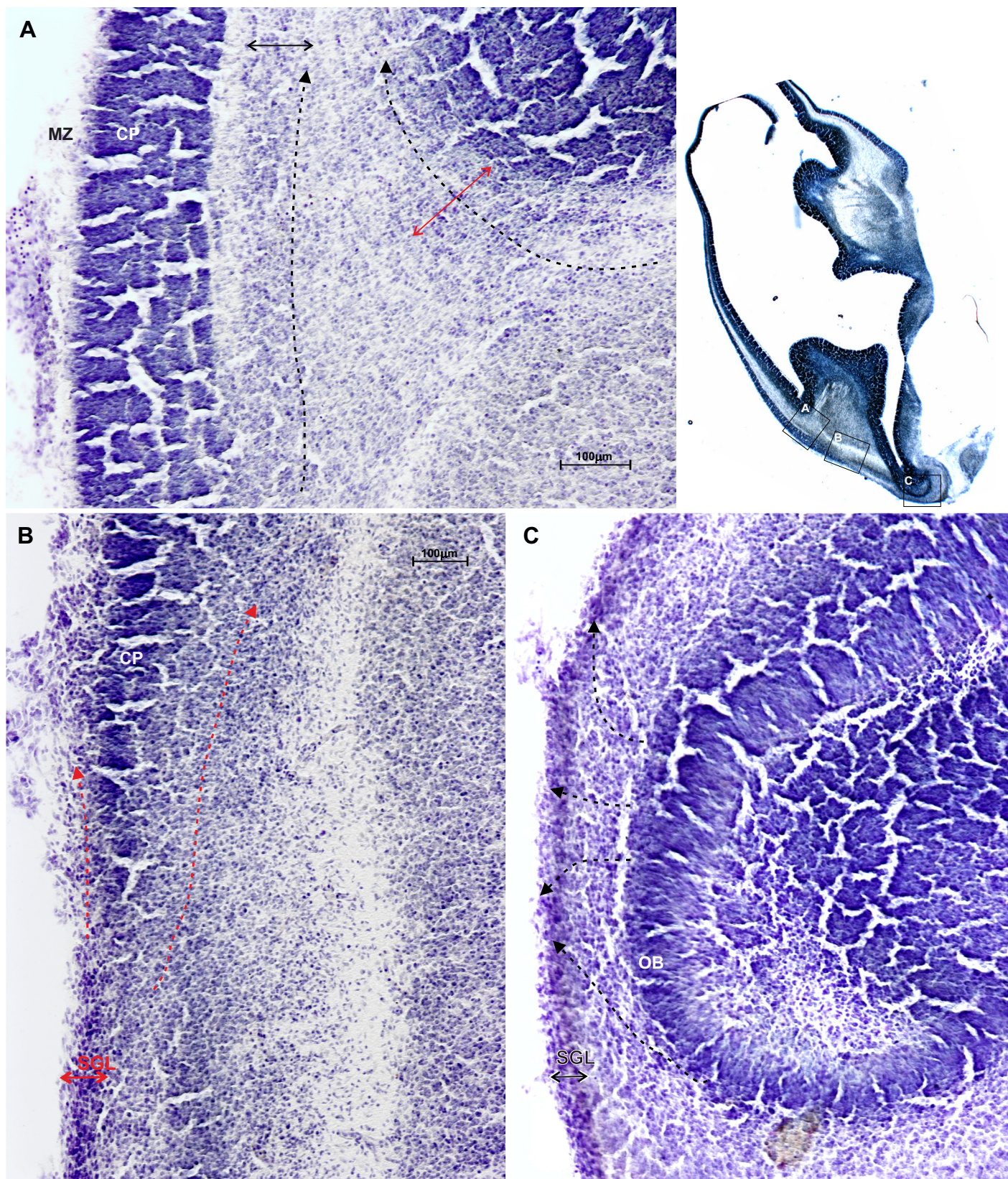
U razini prijelaza subpalijuma u palijum (A) primjetno je kako u marginalnoj zoni nema subprijalnog gomilanja stanica. Kako i kod čovjeka, pojavljuju se dvije nove zone: ispod kortikalne ploče vidljiva je zona (dvostruka strelica) koja najvjerojatnije odgovara tangencijalno migrirajućim stanicama koje dolaze iz bazalnog dijela telencefalona (isprekidana strelica), dok je zona iznad subventrikularne u kontinuitetu sa zonom između ganglijskog brežuljka i strijatuma te predstavlja zonu tangencijalno migrirajućih stanica (isprekidana strelica) koje dolaze iz ganglijskog brežuljka. U području gdje započinje kortikalna ploča (B) subprijalno se može uočiti sloj malih stanica poredanih u 5-8 redova koji najvjerojatnije čine migratorne stanice koje dolaze iz ventralnog dijela te su usmjerene prema kortikalnoj ploči (dvostruka strelica). U ovom području također je vidljiva migratorna zona ispod kortikalne ploče (isprekidana strelica). Subprijalno u području oko proliferativnih olfaktornih zona (C) vidljivo je gomilanje migratornih stanica u subprijalni sloj s više od 5 redova malih stanica (dvostruka strelica). U području oko olfaktornog neuroepitela vidljive su i migratorne stanice kako se odvajaju od proliferativne zone te tvore rostralni migratorni put (isprekidana strelica).

**Slika 5.17** Majmun E46, rezovi obojeni Nissl metodom.

Paneli prikazuju serijske rezove od rostralno prema kaudalno. Panel A prikazuje presjek u području budućeg frontalnog i tjemenog režnja u samom vrhu lateralnih komora. Rez prolazi neposredno iznad dorzalnog hipokampusa. S obzirom da rez prolazi dijelom koji je zavinut, presjek je dijelom i perpendikularan. U lateralnom telencefaličkom zidu vide se dobro razvijena ventrikularna i subventrikularna zona. Subventrikularna zona je slabijeg intenziteta bojenja od ventrikularne zone, a kortikalna ploča doseže debljinu do 10 redova stanica. Intermedijalna zona je relativno tanka. U medijalnom zidu kortikalna ploča je debljine 1-3 reda stanica, ali je prisutna cijelim dijelom zida. Subventrikularna zona je jasno izražena, no tri puta tanja od ventrikularne zone.

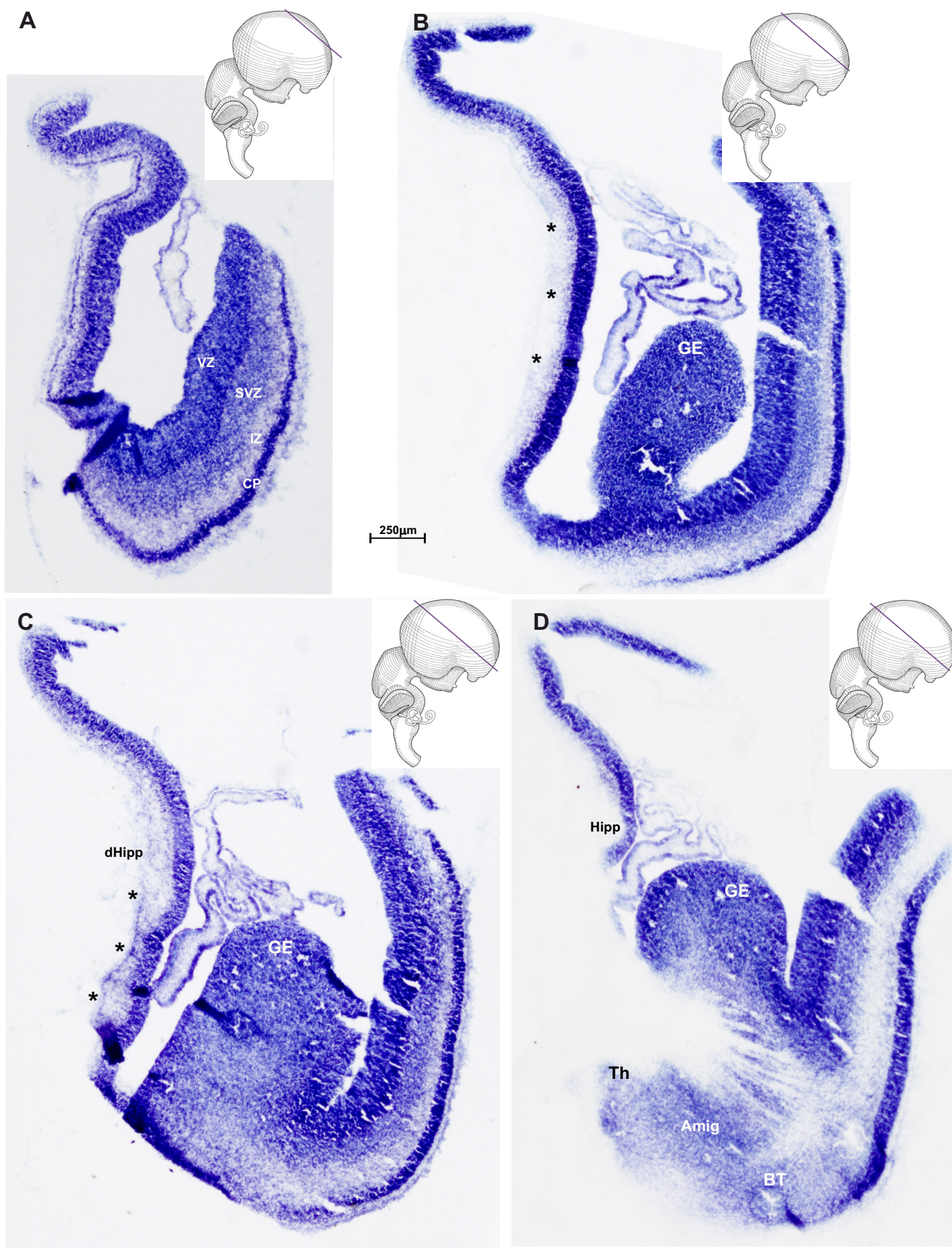
Panel B prikazuje područje budućeg frontalnog i tjemenog režnja na samoj granici dorzalnog hipokampusa i neokorteksa. Na presjeku je vidljiv najdorzalniji dio lateralnog ganglijskog brežuljka te područje gdje ventrikularna zona ganglijskog brežuljka prelazi u ventrikularnu zonu frontalnog režnja. U medijalnom telencefaličkom zidu, kao i na medijalnim polovicama prednjeg i stražnjeg dijela telencefaličkog mjehurića nema kortikalne ploče (zvjezdica). Također, nije jasno vidljiva kontinuirana subventrikularna zona, ali su vidljive





**Slika 5.16** Majmun E48, rezovi obojeni Nissl metodom. Paneli A-C prikazuju uvećane dijelove presjeka prikazanog na slici 5.15A, a točne pozicije prikaza označene su pravokutnicima na umanjenom presjeku reza.





**Slika 5.17** Majmun E46, rezovi obojeni Nissl metodom.

male nakupine stanica u vidu otočića koje najvjerojatnije predstavljaju naznaku iste, barem u graničnom području prema neokorteksu (uvećan prikaz na slici 5.19B).

Na panelu C rez prolazi područjem budućeg frontalnog i tjemenog režnja kroz dorzalni hipokampus, na mjestu gdje se ventrikularna zona nastavlja u koroidni splet. Iz ventrikularne zone koja se nalazi uz spojno mjesto prema koroidnom spletu vide se tračci stanica koji idu prema pijalnoj površini (zvjezdica), ispod koje se rasipaju tvoreći subpijalni granularni sloj (uvećan prikaz na slici 5.19A). Ventrikularna zona ganglijskog brežuljka još je jednako dobro razvijena kao i subventrikularna zona.

Panel D prikazuje presjek kroz ventralni dio frontalnog i tjemenog režnja, a u stražnjem dijelu rez presjeca okcipitalni režanj. Na ovom presjeku vidi se najkaudalniji dio hipokampusa, odnosno prijelaz dorzalnog u ventralni. Medijalni telencefalički zid na ovom je presjeku prisutan samo u kaudalnoj polovici te se prema rostralno nastavlja u koroidni splet koji se nastavlja na spoj ganglijskog brežuljka i diencefalona. Na ovom presjeku vide se amigdala i prateće strukture bazalnog telencefalona, kao i prva talamokortikalna vlakna koja penetriraju kroz strijatum prema lateralnom telencefaličkom zidu. Ovaj presjek prolazi kroz mjesto gdje su povezani talamus i telencefalon (talamički držak).

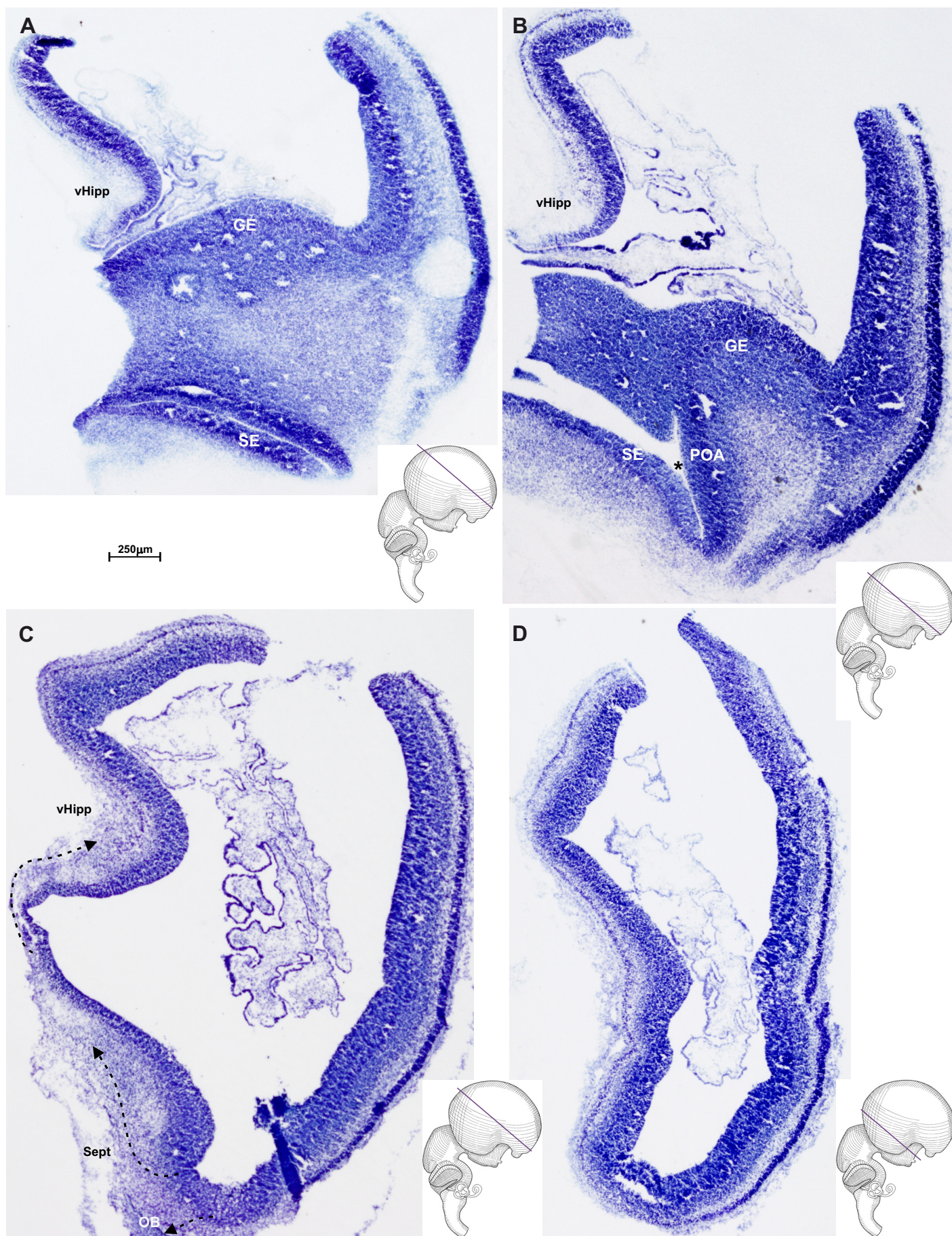
**Slika 5.18** Majmun E46, rezovi obojeni Nissl metodom.

Paneli prikazuju serijske rezove od rostralno prema kaudalno. Panel A prikazuje presjek kroz najventralniji dio frontalnog i tjemenog režnja, a u stražnjem dijelu presjeca okcipitalni režanj. Na ovom presjeku vidi se najkaudalniji dio ventralnog hipokampusa, sa stanicama koje migriraju iz spoja koroidnog spleta i hipokampalne proliferativne zone, kao i iz proksimalnih dijelova samog koroidnog spleta (uvećan prikaz na slici 5.19C). Na ovom presjeku vide se medijalni i lateralni ganglijski brežuljak, kao i dorzalni početak septalne proliferativne zone.

Panel B prikazuje presjek kroz gornji dio sljepoočnog režnja (na slici donja polovica lateralne stijenke) te se nastavlja u okcipitalni režanj (na slici gornja polovica lateralne stijenke i gornji dio lateralnog telencefaličkog mjehurića). Vidljiva je ekstenzija lateralnog ganglijskog brežuljka prema kaudalno te ekstenzija medijalnog ganglijskog brežuljka prema preoptičkom području koje završava u vento-rostralnoj ekstenziji lateralnih komora (paleokortikalni ventrikul, zvjezdica). S medijalne strane paleokortikalni ventrikul omeđuje septalna proliferativna zona. Iako se proliferativne zona preoptičkog i septalnog područja dodiruju u vrhu paleokortikalnog ventrikula, čini se kako nema kontinuiteta između ove dvije zone, ili je on prisutan samo na jednom uskom dijelu.

Panel C prikazuje presjek prolazi kroz sljepoočni i okcipitalni režanj u razini gdje postoji spoj ventralnog hipokampusa i septuma koji se u rostro-ventralnom dijelu nastavlja u





**Slika 5.18** Majmun E46, rezovi obojeni Nissl metodom.

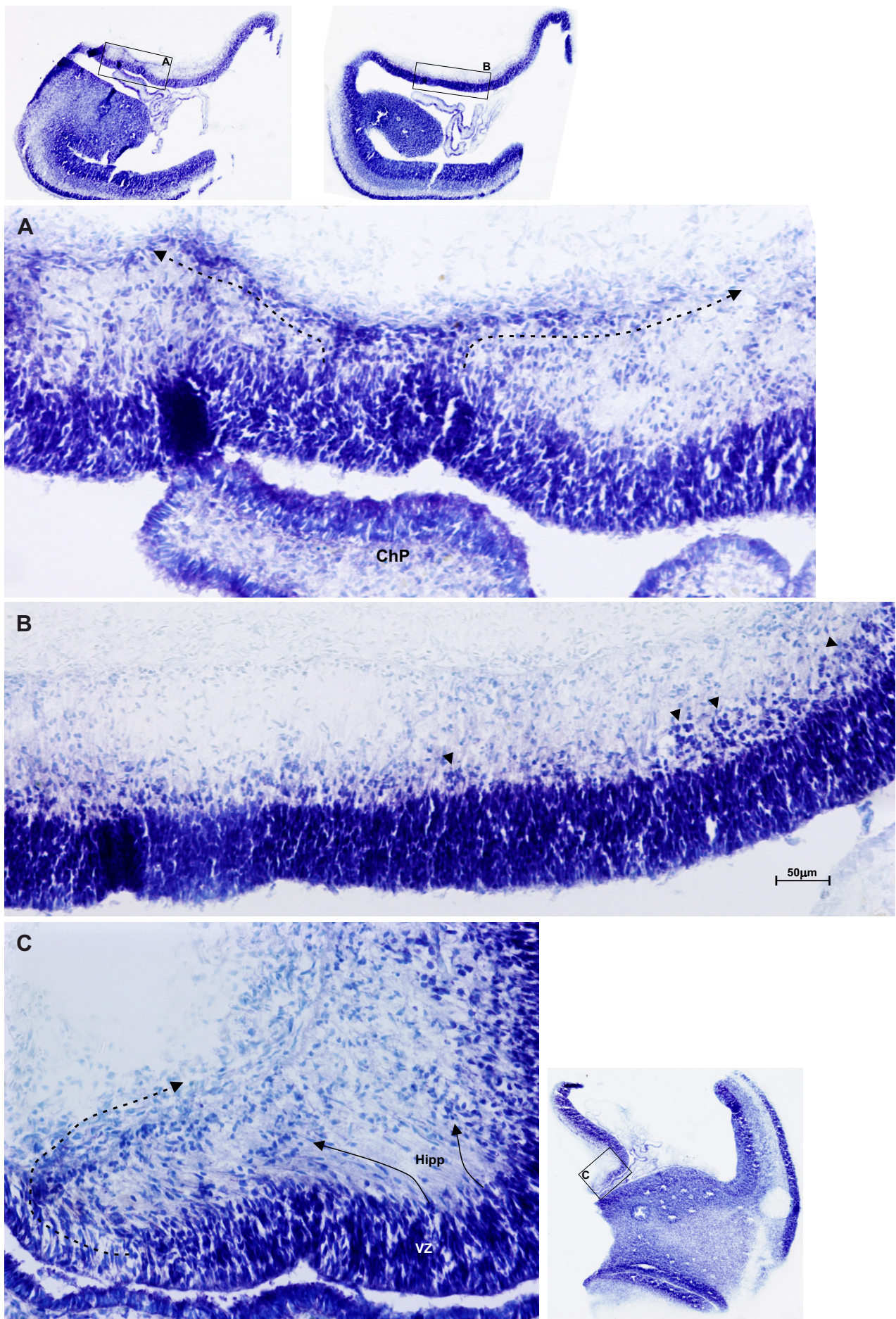
olfaktorni proliferativni epitel. Na ovom presjeku se jasno vidi kako je kortikalna ploča u lateralnom dijelu tanja nego u razinama koje prolaze kroz središnji dio tjemenog i čeonog režnja, a i ventrikularna zona je još uvijek dominantna. U medijalnom telencefaličkom zidu vidljive su zone nakupljanja migratornih stanica (uvećan prikaz na slici 5.20). Najveći broj ovih stanica smješten je iznad vrha paleokortikalnog ventrikula i oko olfaktorne proliferativne zone, a ostale dolaze od proliferativne zone koja se nastavlja na proliferativnu zonu septuma (isprekidane strelice). Ove stanice nakupljaju se u prednjem dijelu medijalnog telencefaličkog zida tvoreći debeli stanični sloj kroz cijelu marginalnu zonu koja je ovdje izrazito zadebljana. Neposredno uz područje gdje se spajaju ventralni hipokampus i septum, a gdje je ventrikularna zona dodatno stanjena, mogu se vidjeti manji tračci stanica koji se pružaju prema površini i smještaju subpijalno (isprekidana strelica). Velika gustoća stanica, od kojih dominiraju one migratornog oblika, prisutna je u hipokampusu.

Panel D prikazuje presjek kroz donji dio tjemenog i okcipitalnog režnja. Vidljivo je kako je na lateralnim stijenkama kortikalna ploča dobro razvijena, a prisutna je i u cijelom medijalnom zidu gdje se sastoji od 2-3 reda stanica. U lateralnoj stijenci dobro je razvijena subventrikularna zona, iako debljinom ne premašuje ventrikularnu zonu. U medijalnoj stijenci ne može se identificirati subventrikularna zona, iako je gornji dio ventrikularne zone rjeđi i sastoji se od disperziranih stanica.

**Slika 5.19** Majmun E46, rezovi obojeni Nissl metodom. Paneli A-C prikazuju uvećane dijelove presjeka prikazanih na slikama 5.17C, 5.17B i 5.18.B, a točne pozicije prikaza označene su pravokutnicima na umanjenim presjecima reza.

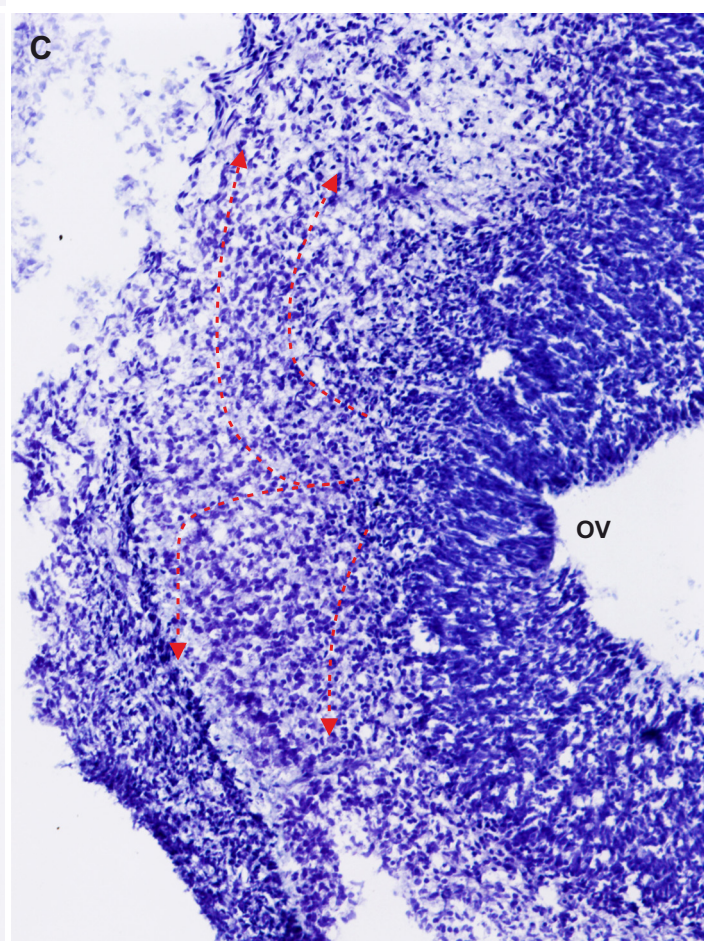
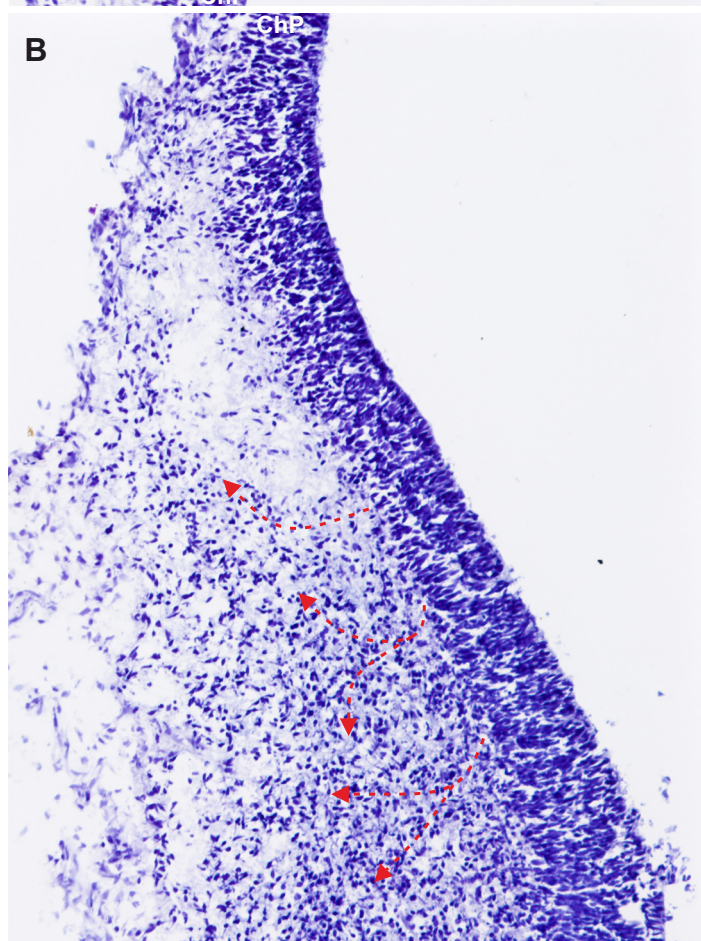
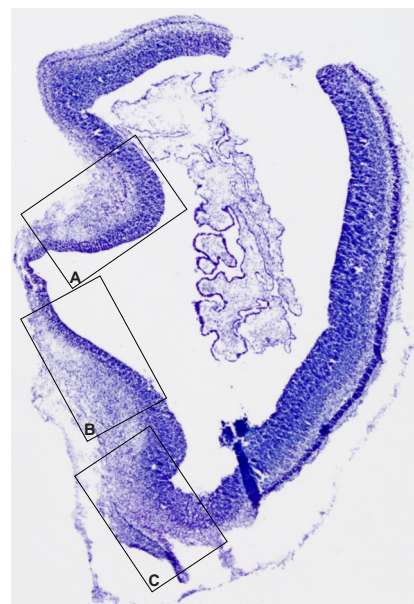
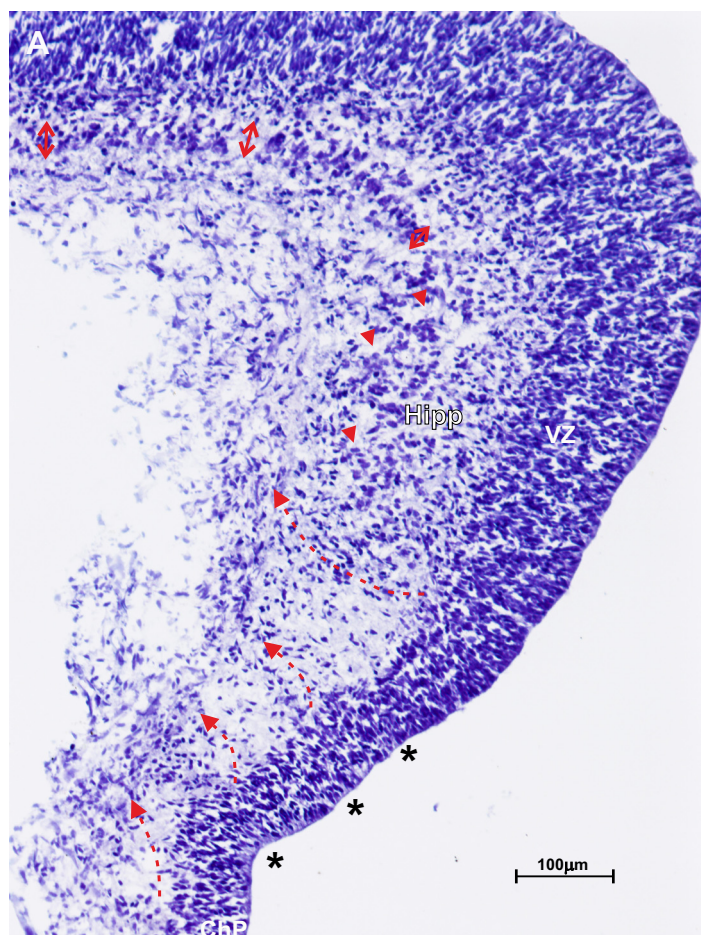
Panel A pokazuje tračke stanica koje idu prema pijalnoj površini ispod koje se rasipaju tvoreći subpijalni granularni sloj (isprekidana strelica). Panel B je presjek koji se nalazi 200µm dorzalnije i na kojem nisu vidljivi tračci ovih migratornih stanica. To ukazuje da se ove stanice stvaraju u vrlo limitiranoj proliferativnoj zoni smještenoj uz mjesto gdje se stvara koroidni splet. Vrhovi strelica pokazuju otočiće stanica koje se ventralnije i dorzalnije, u području neokortikalnih proliferativnih zona, nastavljaju u subventrikularnu zonu. Na panelu A vidljivo je kako intenzitet bojenja i debljina spojnih dijelova proliferativnih zona koroidnog spleta pokazuje intenzivnu aktivnost te se unutar spleta mogu uočiti stanice koje izgledaju kao migratorne. Na panelu C vidljiva je migracija neurona koji dolaze iz uske proliferativne zone (isprekidana strelica) koja se jasno razlikuje od hipokampalne proliferativne zone te koji nastavljaju subpijalno prema dorzalno u marginalnu zonu medijalnog telencefaličkog zida. Stanice koje dolaze iz hipokampalne proliferativne zone formiraju otočiće između subpijalnog sloja i proliferativne zone (strelice).





**Slika 5.19** Majmun E46, rezovi obojeni Nissl metodom. Paneli A-C prikazuju uvećane dijelove presjeka prikazanih na slikama 5.17C, 5.17B i 5.18.B, a točne pozicije prikaza označene su pravokutnicima na umanjenim presjecima reza.





**Slika 5.20** Majmun E46, rezovi obojeni Nissl metodom. Paneli A-C prikazuju uvećane dijelove presjeka prikazanog na slici 5.18C, a točne pozicije prikaza označene su pravokutnicima na umanjenom presjeku reza.

**Slika 5.20** Majmun E46, rezovi obojeni Nissl metodom. Paneli A-C prikazuju uvećane dijelove presjeka prikazanog na slici 5.18C, a točne pozicije prikaza označene su pravokutnicima na umanjenom presjeku reza.

Panel A obuhvaća područje hipokampusa. Proliferativna zona u središnjem dijelu medijalnog zida može se podijeliti u hipokampalnu proliferativnu zonu koja prema gore prelazi u mezokortikalnu proliferativnu zonu i zonu prema koroidnom spletu. Proliferativno područje spoja s koroidnim spletom čini tanja ventrikularna zona od 8-10 redova stanica (zvjezdice). Od ove zone se vide tračci stanica koji idu prema piji i tvore subpijalni sloj (isprekidane strelice). U području hipokampalne ventrikularne zone stanice difuzno napuštaju ventrikularnu zonu koja progresivno zadebljava i tvore otočiće stanica koje se smještaju na 50-100µm od ventrikularne zone (vrhovi strelica). Stanice u ovim otočićima progresivno su diferenciranije idući prema mezokortikalnoj zoni. Od hipokampalne pukotine već je vidljiv kompaktan sloj sastavljen od 2-3 reda stanica (dvostruka strelica), iako se na nekim mjestima može primijetiti diskontinuitet. Ovaj sloj odgovara kortikalnoj ploči, odnosno moguće je da se u ovom području još uvijek radi o sloju prije ploče („preplate“). U mezokortikalnom dijelu se iznad ventrikularne zone nalazi kontinuirani sloj od rjeđe posložena 2-4 reda stanica koji bi mogao odgovarati naznaci subventrikularne zone.

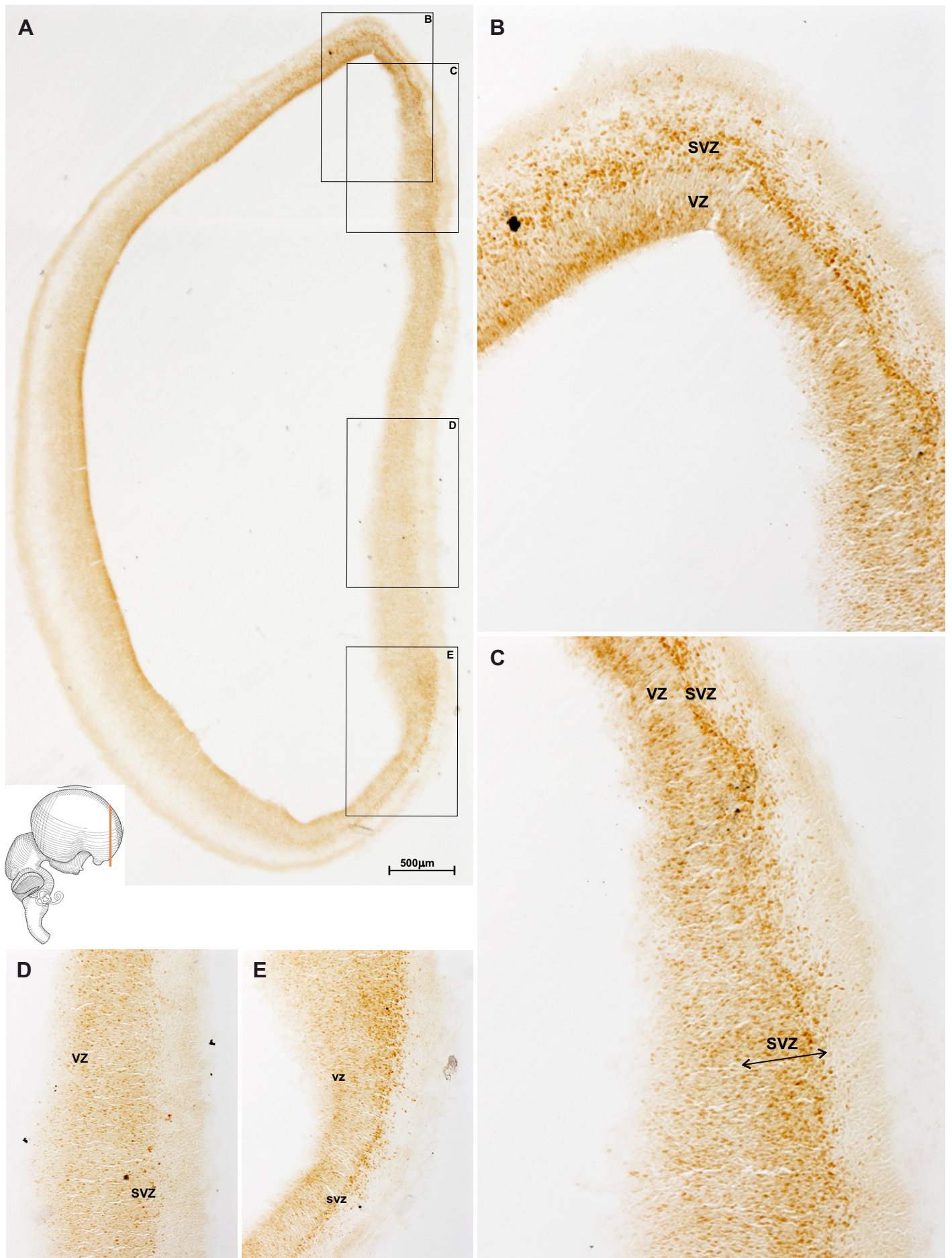
Panel B obuhvaća područje dorzo-kaudalnog dijela septuma. Proliferativna zona se prema paleokortikalnom ventriklu polako zadebljava te se od nje odvaja masa stanica (isprekidane strelice) koja se smješta kroz cijelu debljinu marginalne zone (300-500µm). Na spojnom mjestu prema koroidnom spletu vide se samo pojedinačne stanice usmjerene prema piji.

Panel C obuhvaća područje oko paleokortikalnog ventrikula i njušnog neuroepitela. Cjelokupno područje između proliferativne zone i pije ispunjeno je gusto poredanim migratornim stanicama (isprekidane strelice).

**Slika 5.21** Majmun E48, rezovi obrađeni imunohistokemijski na Mash1. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli B-E.

Presjek prolazi vrhom fronalnog režnja (A). Najintenzivnija Mash1 reaktivnost prisutna je u subventrikularnoj zoni dorzalnog dijela telencefaličkog mjehurića. Gradijent broja reaktivnih stanica i samog intenziteta bojenja ide od medijalnog dijela, gdje je subventrikularna zona u formiranju, do lateralnog gdje reaktivnost polako nestaje. Nešto manja reaktivnost prisutna je u subventrikularnoj zoni ventralnog dijela medijalnog zida, a srednje intenzivno reaktivne stanice sporadično su prisutne kroz medijalni zid. U medijalnom zidu nije jasno razvijena subventrikularna zona, dok je subventrikularna zona najdeblja u lateralnoj stijenci. U lateralnoj stijenci nema jasne reaktivnosti u stanicama subventrikularne zone, iako se ne može isključiti da ipak postoji jedna mala razina ekspresije.





**Slika 5.21** Majmun E48, rezovi obrađeni imunohistokemijski na Mash1. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli B-E.

Na panelu B koji prikazuje uvećani dio dorzalnog vrha telencefaličkog mjerhurića vidljivo je kako dublje trećine ventrikularne zone (smještene uz samu komoru) pokazuju neki stupanj reaktivnosti. U gornjem dijelu ventrikularne zone nalaze se pojedinačne Mash1 pozitivne radijalno orijentirane stanice. Gustoća Mash1 pozitivnih stanica u subventrikularnoj zoni pokazuje gradijent od medijalno gdje je subventrikularna zona najtanja, prema lateralno gdje se njezina debljina povećava.

Na panelu C koji prikazuje uvećani dio dorzalnog dijela medijalnog telencefaličkog zida vidljivo je zadebljanje subventrikularne zone koja ovdje postaje neoštro ograničena (dvostruka strelica). U ventrikularnoj zoni vide se jednolično distribuirane srednje reaktivne Mash1 pozitivne stanice.

Panel D prikazuje uvećani dio središnjeg dijela medijalnog telencefaličkog zida. U gornjem dijelu slike rijetko postavljene Mash1 reaktivne stanice vidljive su samo u ventrikularnoj zoni. Kako ovaj dio predstavlja osnovu budućeg arhikorteksa, subventrikularna zona ovdje nije prisutna. Prema ventralno se ipak rijetke stanice vide u gornjem dijelu proliferativnih zona što može ukazivati na osnovu subventrikularne zone.

Na panelu E koji prikazuje uvećani dio ventralnog dijela medijalnog telencefaličkog zida, vidljiv je sličan obrazac kao i u dorzalnom dijelu medijalnog telencefaličkog zida, ali bez visoke reaktivnosti u najdubljem dijelu ventrikularne zone. Moguće je kako je ovdje stvaranje subventrikularne zone u samom začetku, ili se radi o dijelu telencefalona u kojem je subventrikularna zona slabije razvijena te progenitori više ne dolaze iz ventrikularne zone.

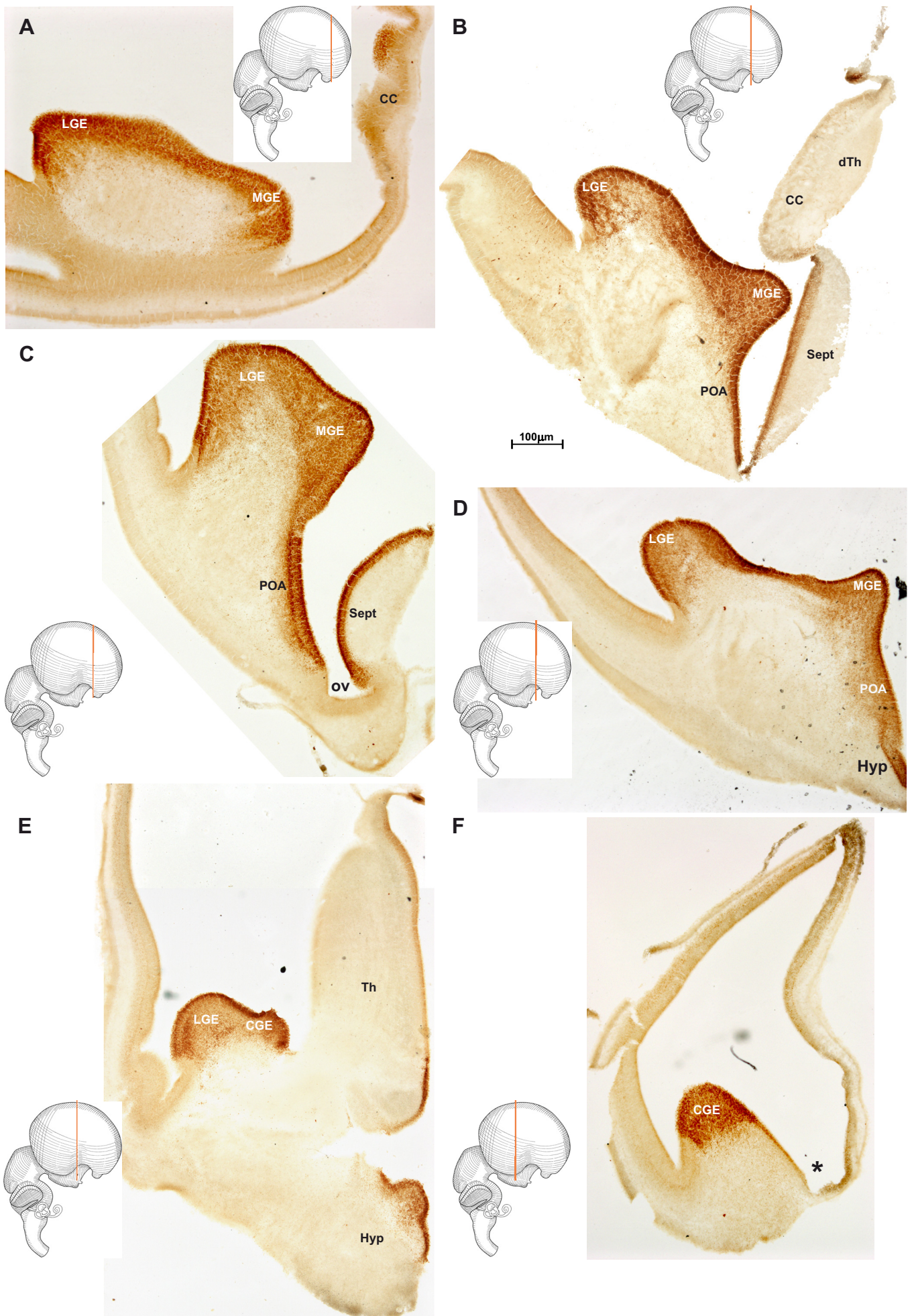
**Slika 5.22** Majmun E48, rezovi obrađeni imunohistokemijski na Mash1.

Paneli prikazuju serijske rezove od rostralno prema kaudalno. Panel A prikazuje presjek kroz frontalni režanj neposredno ispred olfaktornog neuroepitela i septuma. Mash1 reaktivnost prisutna je u ganglijskom brežuljku gdje većina stanica pokazuje visok stupanj ekspresije. Najveća gustoća reaktivnih stanica prisutna je uz samu ventrikularnu zonu. Na medijalnom zidu, dorzalno od mjesta gdje započinje epitel koji će se kaudalno nastaviti u koroidni splet, vidljivo je nakupljanje Mash1 pozitivnih stanica u ventrikularnoj zoni.

Panel B prikazuje presjek u razini završetka septuma koji zahvaća i komisuralnu ploču te vrh talamusa. Mash1 reaktivnost prisutna je u ganglijskom brežuljku koji se prema bazalno nastavlja prema proliferativnoj zoni koja predstavlja rostralnu ekstenziju preoptičkog područja i također pokazuje Mash1 reaktivnost. Mash1 reaktivne stanice nalaze se i u tankoj proliferativnoj zoni medijalnog zida koji se nalazi ispod komisuralne ploče.

Panel C prikazuje presjek u razini septuma i kaudalnog završetka olfaktornog neuroepitela koji se nalazi ispod završetka paleokortikalnog ventrikla. Mash1 ekspresija prisutna je u području ganglijskog brežuljka, proliferativne zone preoptičkog područja, kao i proliferativne zone septuma. Subventrikularna zona ganglijskog brežuljka izrazito je





**Slika 5.22** Majmun E48, rezovi obrađeni imunohistokemijski na Mash1.

ekspandirala već u ovim ranim fetalnim stadijima. U preoptičkom području vidljiva je bilaminarna distribucija Mash1 reaktivnih stanica, što je vezano uz nastanak subventrikularne zone. U septalnom području proliferativna zona je jednolike debljine. Proliferativno područje oko paleokortikalnog ventrikla ne pokazuje Mash1 reaktivnost.

Panel D prikazuje presjek na kojem se preoptička proliferativna zona nastavlja u proliferativnu zonu hipotalamusa. Na ovoj razini vidljivo je stanjenje proliferativne zone između medijalnog i lateralnog ganglijskog brežuljka.

Panel E prikazuje presjek u razini hipotalamusa i prednjeg dijela talamusa. Intenzivna Mash1 reaktivnost prisutna je u većem dijelu hipotalamičke proliferativne zone, osim manjeg dorzalnog dijela, a također je prisutna u donjoj četvrtini ventrikularne zone talamusa. Intenzivna reaktivnost vidljiva je u vrhu treće moždane komore, u medijalnoj liniji gdje započinje koroidni splet.

Panel F prikazuje presjek u razini stražnjeg dijela talamusa, na mjestu prijelaza dorzalnog u ventralni hipokampus. Osim u kaudalnom dijelu ganglijskog brežuljka, Mash1 reaktivne stanice vide se i u ventralnom dijelu telencefaličke zone, što se proteže od ganglijskog brežuljka do u medijalni zid (uvećan prikaz na slici 5.23A), a predstavlja osnovu budućeg temporalnog roga lateralne moždane komore (zvjezdica).

**Slika 5.23** Majmun E48, rezovi obrađeni imunohistokemijski na Mash1. Panel A prikazuje uvećani dio presjeka prikazanog na slici 5.22F, a točna pozicija prikaza označena je pravokutnikom na umanjenom presjeku reza.

Na panelu A vidi se da Mash1 reaktivnost obuhvaća proliferativnu zonu u osnovi buduće lateralne moždane komore.

Panel B prikazuje presjek u razini stražnjeg dijela talamusa. Vidljivo je kako intenzivno reaktivne i gusto poredane Mash1 stanice dominiraju u ventralnom dijelu ventrikularne zone epitalamusa. Zanimljivo je kako su u kaudalnom dijelu talamusa brojni intenzivno reaktivni Mash1 pozitivne stanice prisutne kroz cijelu ventrikularnu zonu.





**Slika 5.23** Majmun E48, rezovi obrađeni imunohistokemijski na Mash1. Panel A prikazuje uvećani dio presjeka prikazanog na slici 5.22F, a točna pozicija prikaza označena je pravokutnikom na umanjenom presjeku reza.

### **5.1.2.2 Ekspresija kalcij vežućih proteina u proliferativnim zonama i tangencijalno migrirajućim stanicama**

Rezovi majmuskog mozga u stadiju E46 obrađeni su imunohistokemijskom metodama za otkrivanje kalcij vežućih proteina kalbindina i kalretinina, biljega GABA-ergičkih neurona.

Stanice s visokom ekspresijom kalbindina oblikuju subpijalno kontinuirani sloj kroz cjelokupan telencefalon (slika 5.24 i 5.25). Osim ovoga sloja, nakupine intenzivno reaktivnih kalbindinskih stanica mogu se vidjeti u skupinama kroz bazalni telencefalon i septum. Ove nakupine prisutne su u nekim od budućih jezgara bazalnog i septalnog telencefalona, uključujući i jezgre amigdala i hipotalamusa (slika 5.24C).

Posebno velika gustoća kalbindinskih stanica prisutna je u rostro-ventralnom dijelu telencefaličkog mjehurića, na spoju između olfaktornog bulbusa i susjedne marginalne zone. Zanimljivo je kako su ove stanice prisutne u dorzalnog dijelu bulbusa, prema telencefaličkoj marginalnoj zoni, dok ih na ventralnom dijelu olfaktornog bulbusa nema. Ove stanice su jasnog migratornog unipolarnog oblika. Vidljiv je gradijent u gustoći intenzivno reaktivnih kalbindinskih stanica od olfaktornog bulbusa prema dorzalnog dijelu telencefalona (slika 5.25C), što ukazuje kako je ovo zona intenzivne proliferacije kalbindinskih stanica.

Stanice sličnog migratornog oblika, ali slabije reaktivnosti prisutne su i u području oko ganglijskog brežuljka te su usmjerene dijelom u intermedijalnu zonu lateralnog telencefaličkog zida, a dijelom prema bazalnom telencefalonu (slika 5.24A). Ovo ukazuje da je već započela intenzivna proliferacija kortikalnih kalbindinskih neurona i njihova migracija u palijum.

U području medijalnog telencefaličkog zida kalbindinska reaktivnost prisutna je u proliferativnim zonama hipokampusa i septuma, kao i u spojnim mjestima prema koroidnom spletu (slike 5.24B i 5.25B). Ove stanice su radijalno orijentirane, a kontinuitet reaktivnosti prisutan je prema piji gdje stanice postaju tangencijalno orijentirane. Intenzivna kalbindinska reaktivnost vidljiva je i u epitelu proksimalnog dijela koroidnog spleta. Osim subpijalno, kalbindinske stanice tvore otočiće u području budućeg hipokampusa, što pokazuje da dio stanica primordijalne hipokampalne ploče izražava kalbindin. Ovakav obrazac reaktivnosti pokazuje da je kalbindin reaktivni dio koroidnog spleta i spojna zona prema koroidnom spletu važan izvor ranih Cajal-Retziusovih stanica, ali i da se kalbindin pozitivne stanice hipokampalne ploče stvaraju fokalno unutar hipokampalnih proliferativnih zona.

Izvan proliferativnih zona kalretininska reaktivnost pokazuje sličnu regionalnu distribuciju kao i kalbindinska, samo jačeg intenziteta (slika 5.26A). U stadiju E46 kalretininska reaktivnost nije zabilježena u koroidnom spletu niti u proliferativnim zonama hipokampusa i palijuma, ali se brojne unipolarne stanice migratorne morfologije mogu vidjeti



u subventrikularnoj zoni ganglijskog brežuljka (slika 5.26E). U subventrikularnoj zoni ganglijskog brežuljka reaktivnost je prisutna između medijalnog i lateralnog dijela. Dio migratornih neurona usmjeren je prema ventralno i medijalno u područje bazalnog telencefalona i preoptičko područje, a dio se usmjerava prema lateralnoj telencefaličkoj stijenci (slika 5.26D). U bazalnom dijelu, na mjestu gdje započinje lateralna stijenka i gdje nema kortikalne ploče, nalaze se gusto zbijene visoko reaktivne kalretininske stanice. Ova zona se proteže od pije do 150-200 $\mu$ m u dubinu te obuhvaća područje od oko 400-500 $\mu$ m pijalne dužine. Od ovog mjesta intenzivno reaktivne kalretininske stanice nastavljaju se prema marginalnoj zoni lateralnog telencefalona, a manje gusto poredane stanice tvore 100-150 $\mu$ m širok sloj ispod kortikalne ploče. Brojne migratorne stanice prisutne su i u subventrikularnoj zoni na samom početku palijuma (kortiko-strijatalna granica), dok se prema dorzalno njihova gustoća naglo smanjuje. Ove stanice čine lateralni migratorni put koji se u ovom stadiju proteže od ganglijskog brežuljka u subventrikularnu zonu palijuma.

Iako je distribucija kalretininskih stanica regionalno vrlo bliska kalbindinskim, treba spomenuti da postoje razlike u laminarnoj distribuciji i gustoći kalretininskih stanica. Subpijalna kalretininska reaktivnost najintenzivnija je u dijelovima telencefalona u kojima je najrazvijenija kortikalna ploča (rosto-ventralno u lateralnom dijelu). Osim subpijalno kao kod kalbindina, intenzivna kalretininska reaktivnost prisutna je i u sloju ispod kortikalne ploče. Sloj ispod kortikalne ploče širi je od sloja kalretininskih stanica u marginalnoj zoni lateralne stijenke telencefalona. U lateralnim dijelovima palijuma kalretininske stanice u sloju ispod kortikalne ploče poredane su u do 10 redova u ventro-rostralnom, pa do 3 reda u dorzo-kaudalnom dijelu. Bilaminarna distribucija intenzivno reaktivnih stanica ispod i iznad kortikalne ploče nestaje u dorzalnom dijelu medijalnog telencefaličkog zida gdje su jače reaktivne stanice gusto poredane kroz 4 do 5 slojeva ispod pije te čine završni dio neokorteksa u kojem se još nije razdvojila primordijalna kortikalna ploče. Ovdje se još mogu zapaziti i slabo reaktivne tangencijalno orijentirane migrirajuće stanice smještene na vrhu subventrikularne zone.

Dalje prema završetku medijalnog zida i osnovi mezokortikalnog područja slabi reaktivnost kalretininskih stanica koje su difuzno raspršene od proliferativnih zona do pije. U osnovi hipokampusa kalretinin stanice postaju jače reaktivne i gusto su zbijene iznad proliferativnih zona. U središnjem dijelu telencefalona veći gornji dio marginalne zone nije ispunjen kalretininskim stanicama, ali u najventralnijem dijelu hipokampalne formacije gotovo cjelokupnu širinu stijenke iznad proliferativnih zona ispunjava sloj gusto poredanih intenzivno reaktivnih kalretininskih stanica. Isto tako je ispunjeno i septalno područje, kao i olfaktorna plakoda.

U medijalnom telencefaličkom zidu može se zapaziti samo manji broj stanica koji imaju unipolarnu migratornu morfologiju karakterističnu za kalretinin pozitivne stanice, ali se

u ostatku stijenke neposredno ispod pije mogu uočiti velike horizontalno orijentirane stanice koje imaju obilježja ranih Cajal-Retziusovih stanica.

Kod majmuna u stadiju E48 korišteno je monoklonalno protutijelo za otkrivanje kalcijum vežućeg proteina kalretinina, a također su korišteni i znatno deblji rezovi (150µm) od onih korištenih u E46 (40-60µm).

Prostorna distribucija kalretininskih stanica pokazuje sličan obrazac u stadijima E46 i E48, uz izrazito povećanje broja i gustoće kalretinin reaktivnih stanica (slike 5.28-5.33). U lateralnom ganglijskom brežuljku vidljive su brojne unipolarne migratorne kalretininske stanice koje se nalaze prvenstveno u subventrikularnoj zoni (slika 5.28 i 5.32C). Kalretinske stanice napuštaju ganglijski brežuljak u uskom području neposredno iznad početka ventrikularne zone dorzalnog telencefalona te se zatim raspršuju i ulaze u subventrikularnu i intermedijalnu zonu lateralnog telencefaličkog mjehurića (lateralni migratorni snop), ali i prema prema bazalnom dijelu telencefalona. U medijalnom dijelu, od ganglijskog brežuljka prema spojnem mjestu s medijalnim telencefaličkim zidom, nalazi se sloj intenzivno reaktivnih stanica koji se nastavlja prema bazalno u marginalnu zonu (slika 5.28C i 5.31C). Kalretininska reaktivnost vidljiva je i u stanicama koroidnog spleta, koje su slične morfologije i jednako gusto poredane kao i kalretininske stanice u središnjem dijelu ganglijskog brežuljka (slika 5.32B). Od koroidnog spleta reaktivnost se po medijalnom zidu subpijalno nastavlja prema bazalnom dijelu i dalje u lateralni telencefalički zid (slika 5.31B). Ovaj tanak medijalni dio telencefaličkog zida, kao i tanka ventrikularna zona koja se proteže od njega prema ganglijskom brežuljku sadrže Mash1 pozitivne stanice (slika 5.23A). Također, u mediodorzalnom dijelu vidljiva je intenzivno kalretinin reaktivna proliferativna zona koja se proteže od hipokampusa prema koroidnom spletu. Od ove zone pojedinačne kalretininske stanice odlaze subpijalno kroz hipokampus prema marginalnoj zoni (slika 5.28C i 5.32A).

Posebno intenzivna kalretininska reaktivnost vidljiva je u marginalnoj zoni bazalnog dijela telencefalona odakle se nastavlja kroz lateralni i medijalni telencefaličkog zida (slika 5.28C). Takav obrazac ukazuje kako ovim putem kalretininske stanice migriraju u sve dijelove telencefalona. U lateralnom telencefaličkom zidu postoji laminarna distribucija kalretininskih neurona (slika 5.29). U marginalnoj zoni se subpijalno nalaze gusto poredane, intenzivno reaktivne kalretininske stanice. Ove stanice, uz veliko horizontalno položeno tijelo, imaju unipolarnu morfologiju s intenzivno reaktivnim horizontalno položenim nastavkom, dajući dojam stanica koje su započele s diferencijacijom. Ovakva morfologija odgovara ranim Cajal-Retziusovim stanicama koje prevladavaju u marginalnoj zoni (slika 5.31A). Treba spomenuti da se povremeno i u sloju ispod kortikalne ploče i u intermedijalnoj zoni mogu zapaziti stanice sličnih obilježja (slika 5.29B). U donjem dijelu kortikalne ploče nalazi se sloj stanica koje su vertikalno orijentirane s ovalnim tijelom i uglavnom pokazuju srednji stupanj reaktivnosti. No, kroz kortikalnu ploču se mogu zapaziti i pojedinačne kalretininske stanice

horizontalne orijentacije, dajući dojam da se radi o migratornim stanicama. U subventrikularnoj zoni nalazi se dosta kalretininskih stanica slabe do srednje intenzivne reaktivnosti što ukazuje kako stanice u subventrikularnoj zoni postaju reaktivnije. Uz ventrikularnu zonu sporadično se mogu uočiti srednje intenzivno reaktivne kalretininske stanice.

U dorzalnim dijelovima lateralnog telencefaličkog zida cjelokupna kortikalna ploča sadrži gusto poredane stanice srednje intenzivno reaktivne na kalretinin (slika 5.30). Vidljivo je kako nema razdvajanja kalretininske ploče u dorzalnim dijelovima te da je ona u dijelu budućeg arhipalijuma deblja nego u susjednim neopalijalnim područjima i zahvaća gotovo polovicu telencefaličkog zida. U području budućeg hipokampusu ovaj sloj se razdvaja u dvije zone. Tanja zona ostaje subpijalno i sadrži slabo do srednje reaktivne kalretininske stanice dok se ispod nastavlja jednako debela zona bez reaktivnosti ispod koje se nalazi debeli sloj gusto poredanih, srednje jako do intenzivno reaktivnih kalretininskih neurona. Iako je ovaj obrazac prisutan i u stadiju E46, u hipokampusu je najjasnije vidljivo povećanje intenziteta, broja i gustoće kalretininskih stanica. Zanimljivo je kako se od hipokampalnih kalretininskih neurona prema proliferativnoj zoni koja čini spoj prema koroidnom spletu pružaju gusto poredani nastavci s karakteristikama aksona koji završavaju na ventrikularnoj površini. Na nekoliko mjesta takvi nastavci se mogu vidjeti i u ostatku hipokampalne proliferativne zone.

Kalretininska reaktivnost vidljiva je i u stanicama bazalnog telencefalona i amigdale. U diencefalonu se u hipotalamičkom dijelu izvan proliferativnih zona nalaze nakupine srednje intenzivno reaktivnih stanica, no ipak većina hipotalamusa ne pokazuje reaktivnost na kalretinin. U proliferativnim zonama hipotalamusa nema kalretininske reaktivnosti, za razliku od talamusa (slika 5.28B). U ventralnom dijelu talamičke proliferativne zone, u kojoj je vidljiva Mash1 reaktivnost (slika 5.22E), dolazi do nakupljanja srednje reaktivnih kalretininskih stanica koji su kroz usko područje usmjerene lateralno i ventralno prema bazalnom telencefalonu. Dorzalnije, u većem srednjem dijelu talamičke proliferativne zone, vidljiva je izrazito intenzivna kalretininska reaktivnost. Ovaj intenzivno reaktivan sloj stanjuje se od ventralno prema dorzalno. Od najdebljeg ventralnog dijela pružaju se prema lateralnoj površini talamusa radijalno orijentirani stupići, a u središnjem dijelu prema lateralnoj površini sve je veći broj kalretininskih stanica. U središnjem dijelu lateralne površine također je prisutna izrazita kalretininska reaktivnost. Od ovog dijela prema dorzalno su kroz lateralni zid, slično kao i u marginalnoj zoni telencefalona, vidljive brojne kalretininske stanice. U središnjem dijelu telencefalona ova reaktivnost se nastavlja i kroz epitalamus sve do središnje linije.

## Deskriptivna analiza kalbininskih i kalretininskih rezova

**Slika 5.24** Majmun E46, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalbindin. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli B-D.

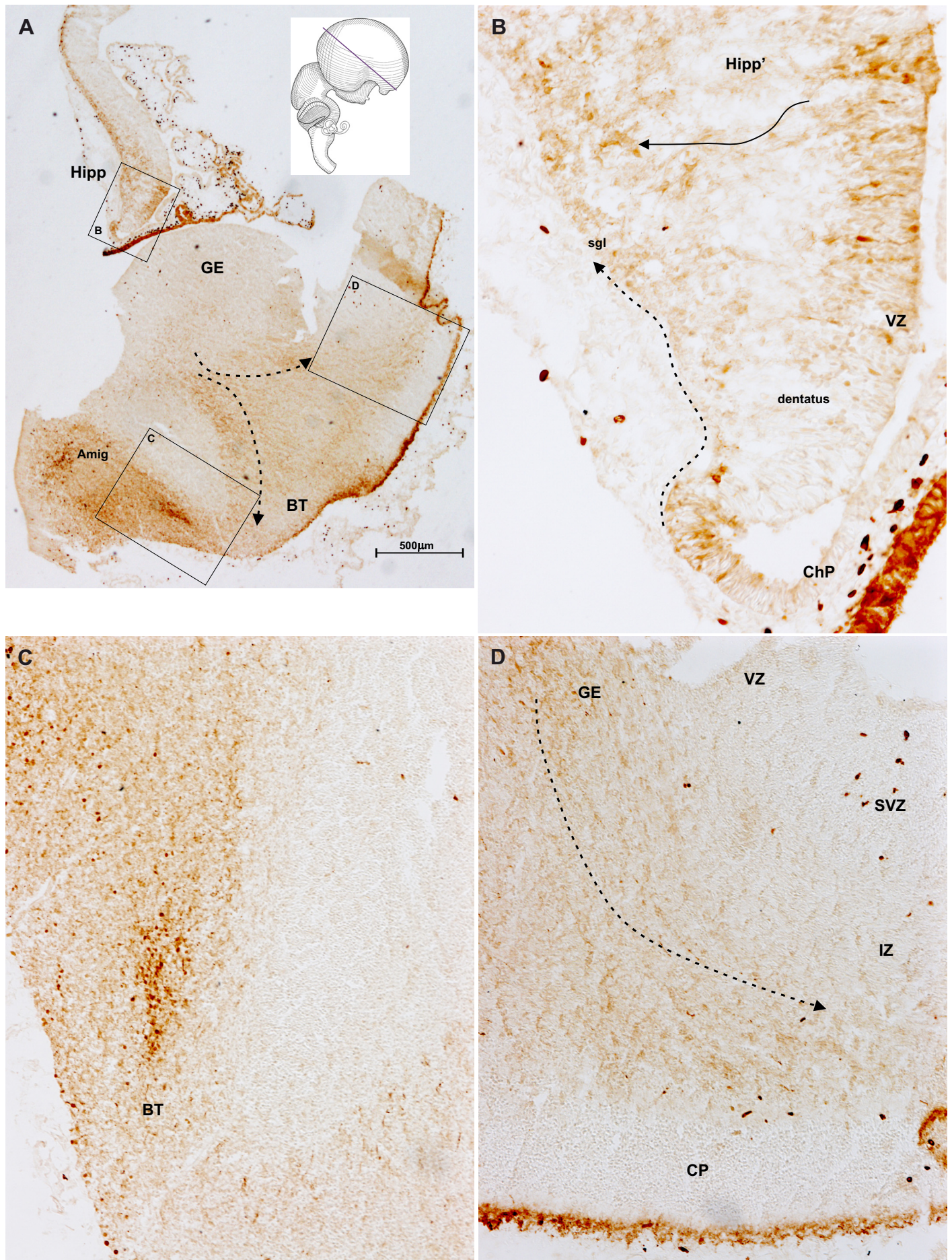
Panel A prikazuje presjek kroz najventralniji dio frontalnog i tjemenog režnja. Na ovom presjeku vidi se najkaudalniji dio ventralnog hipokampusa, medijalni i lateralni ganglijski brežuljak, kao i strukture bazalnog telencefalona s amigdalama. U kortikalnim dijelovima većina intenzivno reaktivnih stanica nalazi se u marginalnoj zoni subpijalno. Može se zapaziti da postoji gradijent u gustoći ovih stanica od ventralno prema dorzalno i zatim medijalno. Iz ganglijskog brežuljka izlaze stanice koje imaju migratornu unipolarnu morfologiju te su usmjerene lateralno u intermedijalnu zonu i ventralno prema bazalnom telencefalonu (isprekidane strelice). U bazalnom telencefalonu velik broj stanica izražava kalbindin te je vidljivo grupiranje intenzivno reaktivnih stanica koje odgovaraju budućim jezgrama medio-bazalnog telencefalona i amigdalama. U hipokampusu je vidljiva reaktivnost u dijelu proliferativnih zona i u proliferativnim zonama prema koroidnom spletu, gdje je najproksimalniji dio epitela također intenzivno reaktivan na kalbindin. Na susjednim Nissl rezovima (slika 5.18A) jasno se vide stanice koje migriraju iz spoja koroidnog spleta i hipokampalne proliferativne zone, kao i iz proksimalnih dijelova samog koroidnog spleta. U području hipokampusa otočići kalbindin pozitivnih stanica nalaze se u sredini marginalne zone.

Panel B prikazuje područje u kojem se hipokampus nastavlja u koroidni splet. Radijalno orijentirane stanice epitela na spoju koroidnog spleta i telencefalona pokazuju reaktivnost na kalbindin, kao i dio radijalno orijentiranih neurona hipokampalne proliferativne zone. Najmedijalniji dio proliferativne zone, koji odgovara proliferativnoj zoni dentatusa, ne pokazuje kalbindinsku reaktivnost. Od kalbindin reaktivne zone na spoju koroidnog spleta vide se stanice usmjerene dorzalno prema subpijalnom dijelu marginalne zone (isprekidana strelica). Od stanica hipokampalne proliferativne zone vide se reaktivne stanice koje se smještaju u marginalnu zonu (strelica). Na slici se također vidi kako je dio koroidnog spleta intenzivno reaktivan.

Na panelu C (zaokrenut za 70°) vidljivo je kako većina stanica bazalnog telencefalona pokazuje određeni stupanj reaktivnosti na kalbindin, ali i nakupljanje intenzivno reaktivnih stanica koje predstavljaju osnovu budućih jezgara medio-bazalnog telencefalona.

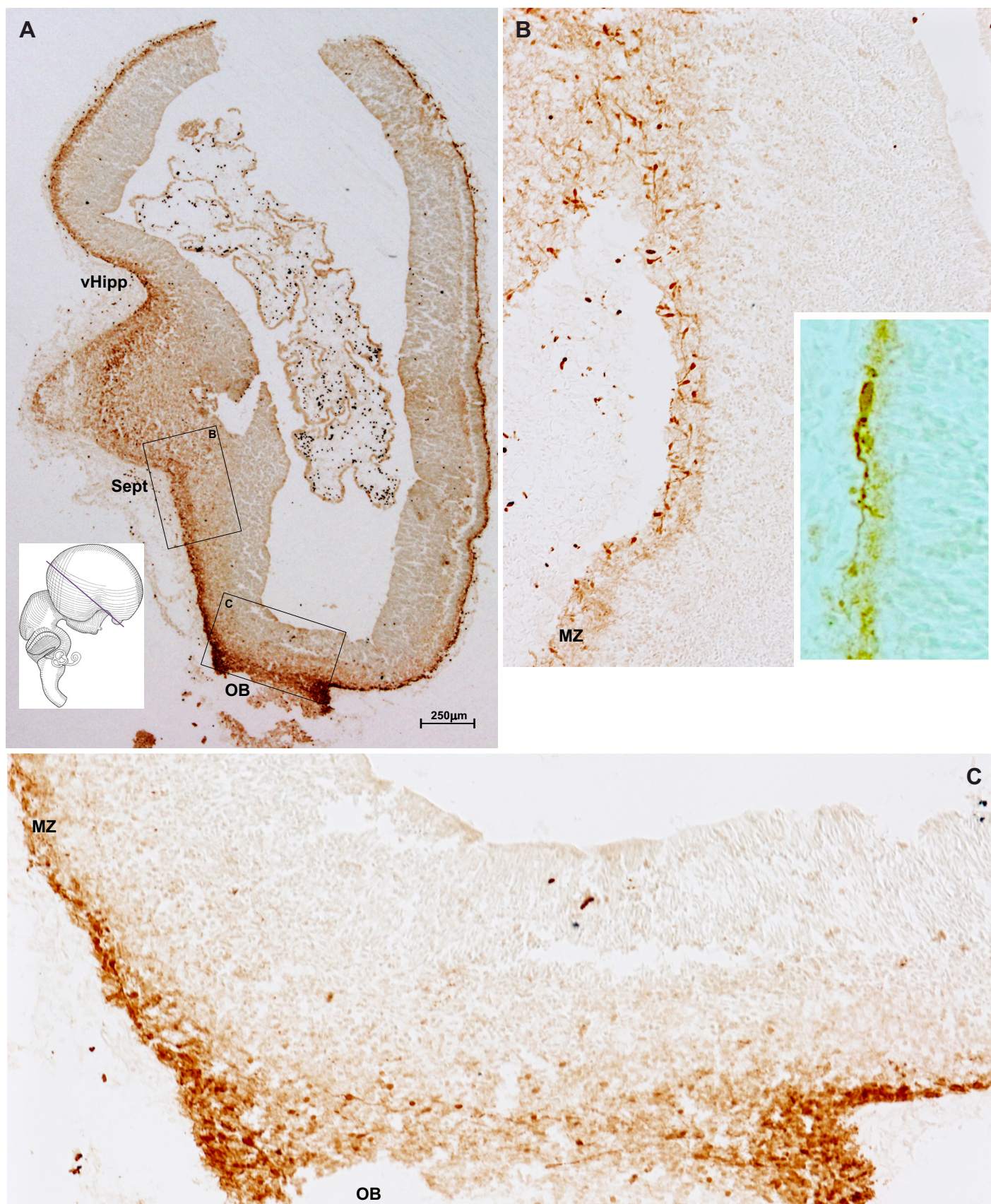
Panel D prikazuje prijelaz ganglijskog brežuljka u lateralni telencefalon. Na slici se vide subpijalno smještene kalbindinske stanice, koje su u ovom dijelu poredane u 3 sloja. Vidljivo je kako gustoća i stupanj reaktivnosti slabi od ventralno prema dorzalno. Slabije reaktivne, ali brojne unipolarne migratorne stanice napuštaju ganglijski brežuljak i ulaze u intermedijalnu zonu lateralnog telencefalona (isprekidana strelica).





**Slika 5.24** Majmun E46, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalbindin. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli B-D.





**Slika 5.25** Majmun E46, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalbindin. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli B i C.

**Slika 5.25** Majmun E46, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalbindin. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli B i C.

Na panelu A presjek prolazi kroz sljepoočni i okcipitalni režanj u razini spoja ventralnog hipokampusa i septuma te koji se u rostro-ventralnom dijelu nastavlja u olfaktorni proliferativni epitel. Najveća gustoća kalbindin pozitivnih stanica vidljiva je na spoju olfaktornog bulbosa i marginalne zone. Gradijent gustoće prisutan je kroz lateralni i medijalni telencefalički zid od ventro-rostralno prema dorzo-kaudalno.

Panel B prikazuje središnji medijalni dio telencefalona gdje septalno područje prelazi u spoj prema ventralnom hipokampusu. U ovom dijelu jasno se razaznaje migratorna unipolarna morfologija intenzivno reaktivnih kalbindinskih stanica marginalne zone (umetak).

Panel C prikazuje rostro-ventralni dio telencefalona na spoju s olfaktornim epitelom. Velika gustoća stanica koje počinju poprimati unipolarni migratorni oblik na spoju koji se nastavlja u olfaktorni tračak ukazuje da kalbindinski neuroni potječu iz susjednih proliferativnih zona.

**Slika 5.26** Majmun E46, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalretinin. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli B-E.

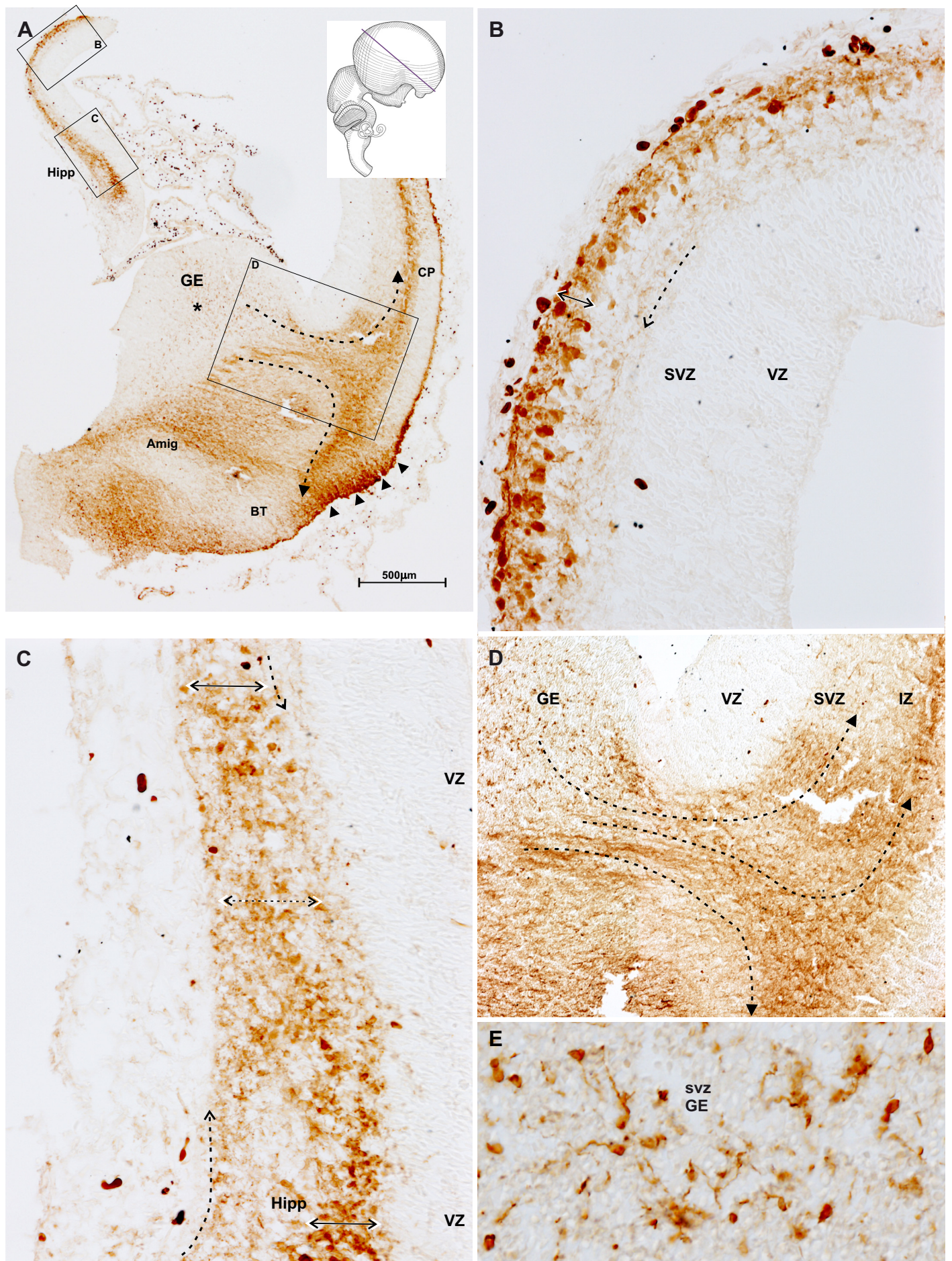
Panel A prikazuje presjek kroz najventralniji dio frontalnog i tjemnog režnja. Na ovom presjeku vidi se najkaudalniji dio ventralnog hipokampusa, medijalni i lateralni ganglijski brežuljak, kao i strukture bazalnog telencefalona s amigdalama. U palijalnim dijelovima većina intenzivno reaktivnih stanica nalazi se u marginalnoj zoni i sloju ispod kortikalne ploče. Veću debljinu ima sloj ispod kortikalne ploče, a može se zapaziti kako postoji gradijent u smanjenju širine od ventralno prema dorzalno kroz lateralnu stijenu. Brojne unipolarne stanice s migratornom morfologijom mogu se vidjeti u subventrikularnoj zoni ganglijskog brežuljka (uvećano kao panel E). U subventrikularnoj zoni ganglijskog brežuljka reaktivnost je prisutna u području između medijalnog i lateralnog dijela (zvjezdica). Dio migratornih neurona usmjeren je prema lateralnoj telencefaličkoj stijenci, a dio se usmjerava prema ventralno i medijalno u područje bazalnog telencefalona i preoptičko područje (isprekidane strelice). U bazalnom dijelu telencefalona, na granici prema palijumu i gdje nema prisutne kortikalne ploče, površno su vidljive gusto zbijene visoko reaktivne kalretininske stanice (vrh strelice), a intenzivna reaktivnost se nastavlja prema marginalnoj zoni palijuma. Od lateralnog dijela ganglijskog brežuljka odlazi dio stanica te se nastavlja u sloj ispod kortikalne ploče i intermedijalnu zonu (D), ali brojne migratorne stanice prisutne su i u subventrikularnoj zoni s gradijentom gustoće od kortiko-strijatalne granice prema dorzalno. U lateralnom zidu sloj kalretininskih stanica ispod kortikalne ploče širi je od sloja kalretininskih stanica u marginalnoj zoni. U dorzalnom dijelu medijalnog telencefaličkog zida (B) nestaje bilaminarna distribucija intenzivno reaktivnih stanica ispod i iznad kortikalne

ploče. Iznad subventrikularne zone naziru se slabo reaktivne tangencijalno orijentirane migrirajuće stanice (isprekidana strelica), a jače reaktivne stanice gusto su poredane kroz 4-5 slojeva ispod pije. Ovo područje je završni dio neokorteksa u kojem se još nije razdvojila primordijalna kortikalne ploče (dvostruka strelica). Reaktivnošću i veličinom posebno se ističu horizontalno orijentirane subpijalne stanice, rane Cajal-Retziusovih stanica. Dalje prema završetku medijalnog zida (C) slabi reaktivnost kalretininskih stanica koje su difuzno raspršene od proliferativnih zona do pije (dvostruka isprekidana strelica) što ukazuje kako se radi o osnovi mezokortikalnog područja, odnosno prijelazu neokorteksa u arhikorteks. Značajno različita distribucija kalretininskih stanica vidljiva je u osnovi hipokampusa gdje su ove stanice gusto zbijene i reaktivne, ali smještene neposredno iznad proliferativnih zona dok široki ostatak stijenke nije ispunjen kalretininskim stanicama, izuzev sporadičnih subpijalno smještenih tangencijalno orijentiranih stanica (isprekidana strelica).

**Slika 5.27** Majmun E46, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalretinin. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli B-D.

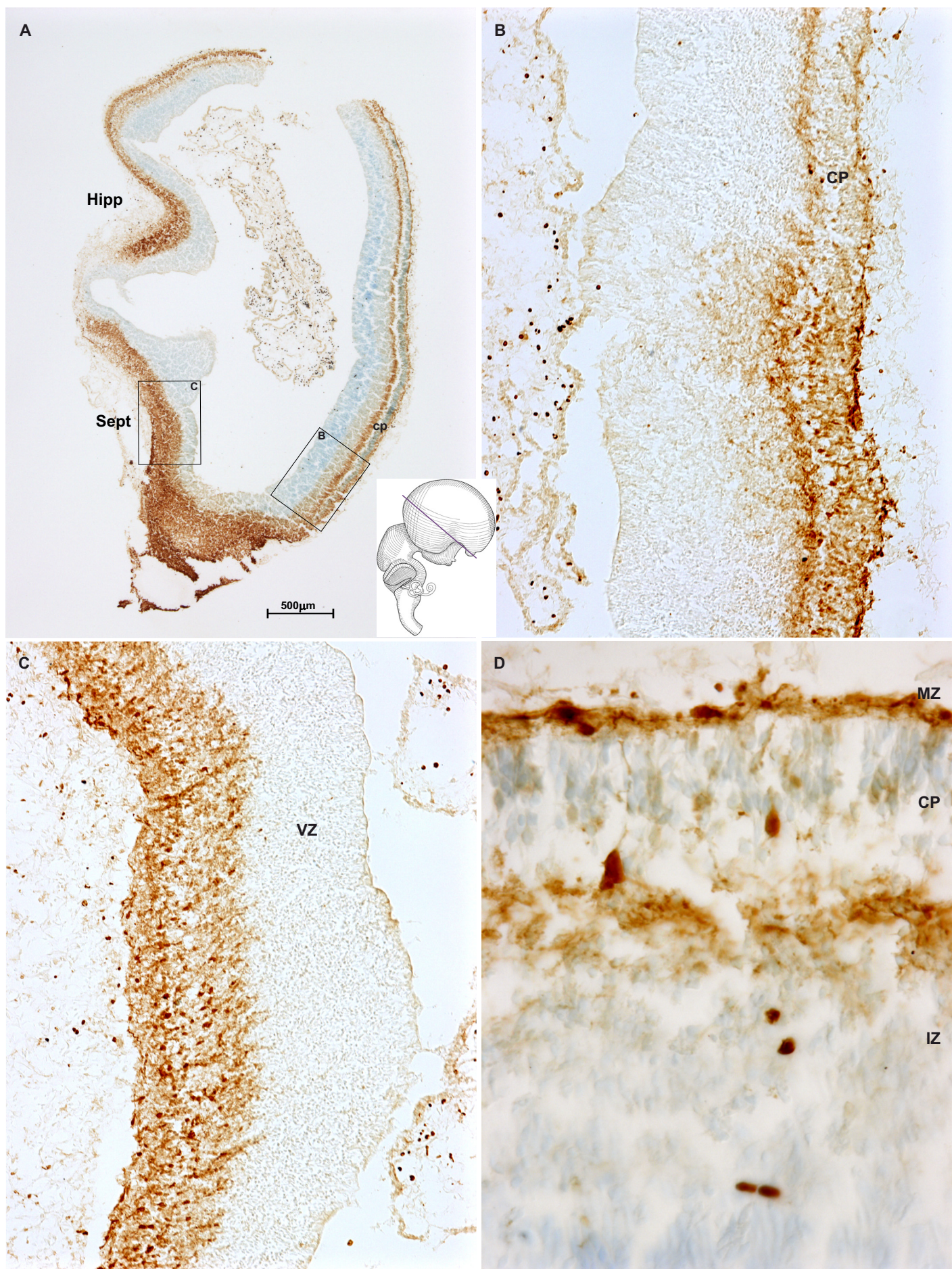
Na panelu A presjek prolazi kroz sljepoočni i okcipitalni režanj u razini spoja ventralnog hipokampusa i septuma te koji se u rostro-ventralnom dijelu nastavlja u zonu gdje se spajaju medijalni ganglijski brežuljak i olfaktorna proliferativna zona. Vidljivo je kako su u ovom području te u septumu i hipokampusu kalretininske stanice gusto poredane kroz cjelokupnu površinu izvan proliferativnih zona. Međutim, nema kontinuiteta ovih staničnih nakupina od septuma prema hipokampusu. Također je vidljivo kako se u dorzo-medijalnom dijelu telencefaličkog mjehurića većina kalretininskih stanica smješta iznad kortikalne ploče u marginalnu zonu, dok je u lateralnom dijelu telencefaličkog mjehurića (B) širi sloj stanica ispod kortikalne ploče, nego u marginalnoj zoni. Na prijelazu dorzalnog u medijalni zid cjelokupno područje iznad proliferativnih zona gusto je ispunjeno kalretininskim stanicama. U ventralnom dijelu lateralnog telencefaličkog zida (B) vidljiva je bilaminarna distribucija kalretininske reaktivnosti ispod i iznad kortikalne ploče, dok takva distribucija prema bazalno nestaje, a stanice ispunjavaju cjelokupnu primordijalnu marginalnu zonu. U medijalnom telencefaličkom zidu (C) površno su vidljive unipolarne migratorne stanice, dok intenzivno reaktivne stanice dominiraju u središnjem dijelu iznad proliferativnih zona. Cjelokupno preostalo područje izvan proliferativnih zona ispunjeno je slabije do srednje reaktivnim kalretininskim stanicama. Panel D prikazuje uvećani dio lateralne telencefaličke stijenke s jasnom raspodjelom kalretininskih stanica na tanju marginalnu zonu te 3 do 4 puta deblji sloj ispod kortikalne ploče. Uočljivo je i nekoliko dobro diferenciranih horizontalno orijentiranih stanica marginalne zone, kao i velike polimorfne stanice u sloju pod pločom te relativno dobro diferencirana piriformna stanica u kortikalnoj ploči.





**Slika 5.26** Majmun E46, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalretinin. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli B-E.





**Slika 5.27** Majmun E46, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalretinin. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli B-D.

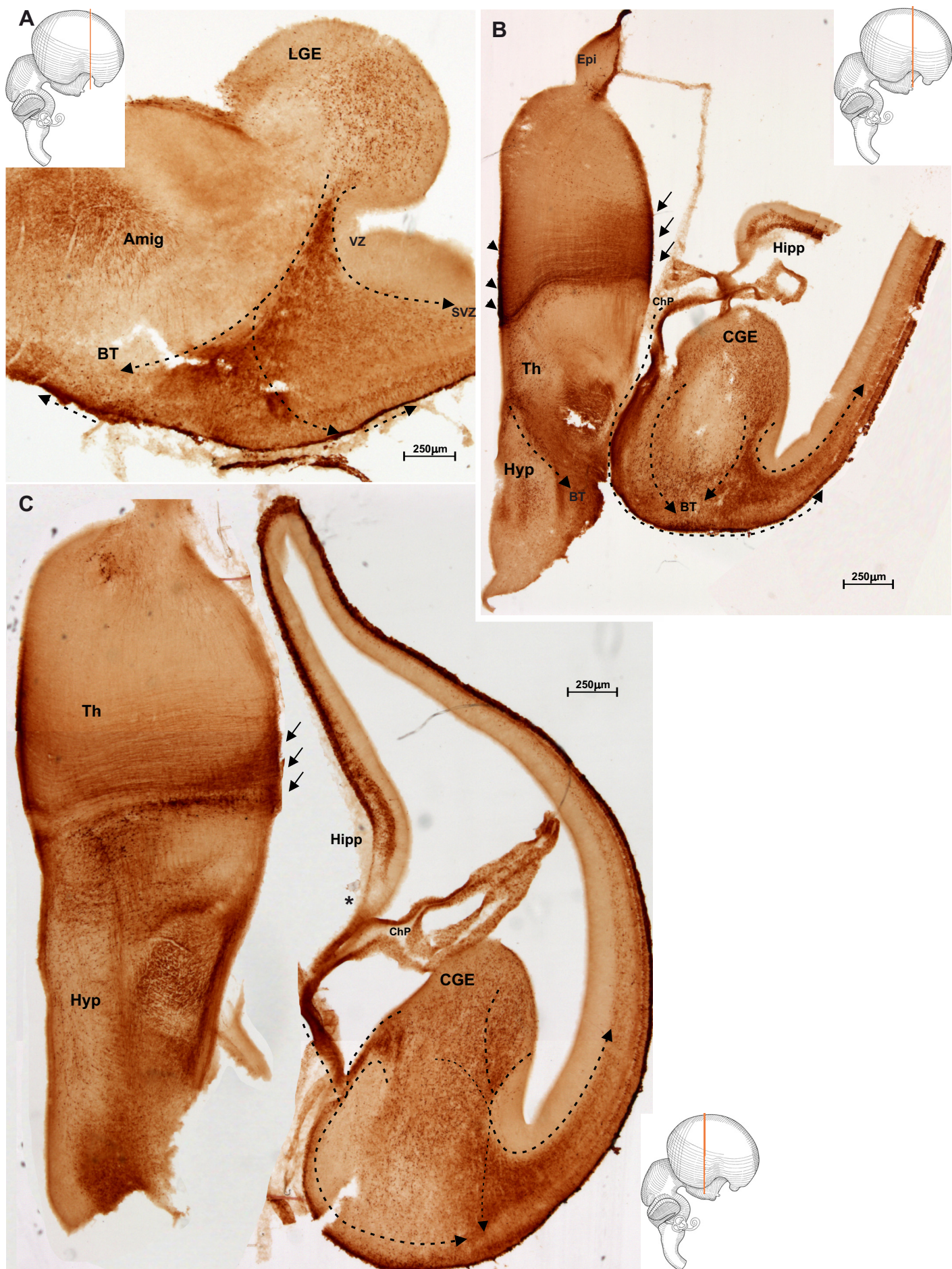


**Slika 5.28** Majmun E48, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalretinin.

Panel A prikazuje presjek u razini rostralnog dijela preoptičke proliferativne zone. U lateralnom ganglijskom brežuljku vidljive su brojne kalretinin reaktivne stanice unipolarne migratorne morfologije koje se nalaze prvenstveno u subventrikularnoj zoni odakle se usmjeravaju prema granici palijuma. Kalretinske stanice napuštaju ganglijski brežuljak u uskom području neposredno iznad početka ventrikularne zone dorzalnog telencefalona (početni dio između dvije isprekidane strelice) te se zatim raspršuju i ulaze u subventrikularnu i intermedijalnu zonu lateralnog telencefaličkog mjehurića (lateralni migratorni snop). Dio stanica odlazi prema bazalnom dijelu telencefalona gdje je reaktivnost posebno izražena u marginalnoj zoni i koja se proteže kroz cjelokupan telencefalon. To ukazuje kako se ove stanice gomilaju subpijalno. Kako se intenzivna stanična reaktivnost marginalne zone proteže od bazalnog preko lateralnog i medijalnog telencefaličkog zida (C) može se zaključiti kako ovim putem migriraju kalretininske stanice u sve dijelove telencefalona. Kalretininska reaktivnost vidljiva je i u području amigdala.

Panel B prikazuje presjek u razini hipotalamusa i prednjeg dijela talamusa. Brojne unipolarne kalretininske stanice vidljive su u ganglijskom brežuljku od kojeg odlaze prema lateralnom telencefaličkom zidu i prema bazalnom telencefalonu. Dio kalretininskih stanica iz ganglijskog brežuljka usmjeren je kroz medijalni dio prema bazalnom telencefalonu (isprekidane strelice). Kalretininska reaktivnost vidljiva je i u stanicama koroidnog spleta od kojega se po medijalnom zidu subpijalno nastavlja prema bazalnom dijelu i dalje u lateralni telencefalički zid (isprekidana strelica). U lateralnom telencefaličkom zidu postoji laminarna distribucija kalretininskih stanica. U diencefalonu se u hipotalamičkom dijelu izvan proliferativnih zona nalaze nakupine srednje intenzivno reaktivnih stanica. U proliferativnim zonama hipotalamusa nema kalretininske reaktivnosti, za razliku od talamusa. U ventralnom dijelu talamičke proliferativne zone, u kojoj je vidljiva Mash1 reaktivnost (slika 5.slika 5.22E), dolazi do nakupljanja srednje reaktivnih kalretininskih stanica koje su kroz usko područje usmjerene lateralno i ventralno prema bazalnom telencefalonu (isprekidana strelica). Dorzalnije, u većem srednjem dijelu talamičke proliferativne zone, vidljiva je izrazito intenzivna kalretininska reaktivnost (vrhovi strelica). Ovaj intenzivno reaktivan sloj stanjuje se od ventralno prema dorzalno. Od najdebljeg ventralnog dijela pružaju se prema lateralnoj površini talamusa radijalno orijentirani stupići, a u središnjem dijelu prema lateralnoj površini sve je veći broj kalretininskih stanica. U središnjem dijelu lateralne površine također je prisutna izrazita kalretininska reaktivnost (strelice). Od ovog dijela prema dorzalno se kroz lateralni zid (slično kao i u marginalnoj zoni telencefalona) nalaze brojne kalretininske stanice te se to nastavlja i kroz epitalamus sve do središnje linije.

Panel C prikazuje presjek u razini stražnjeg dijela talamusa. Obrazac bojenja vrlo je sličan obrascu na panelu B, no na ovom je presjeku jasnije izraženo da su kalretinin



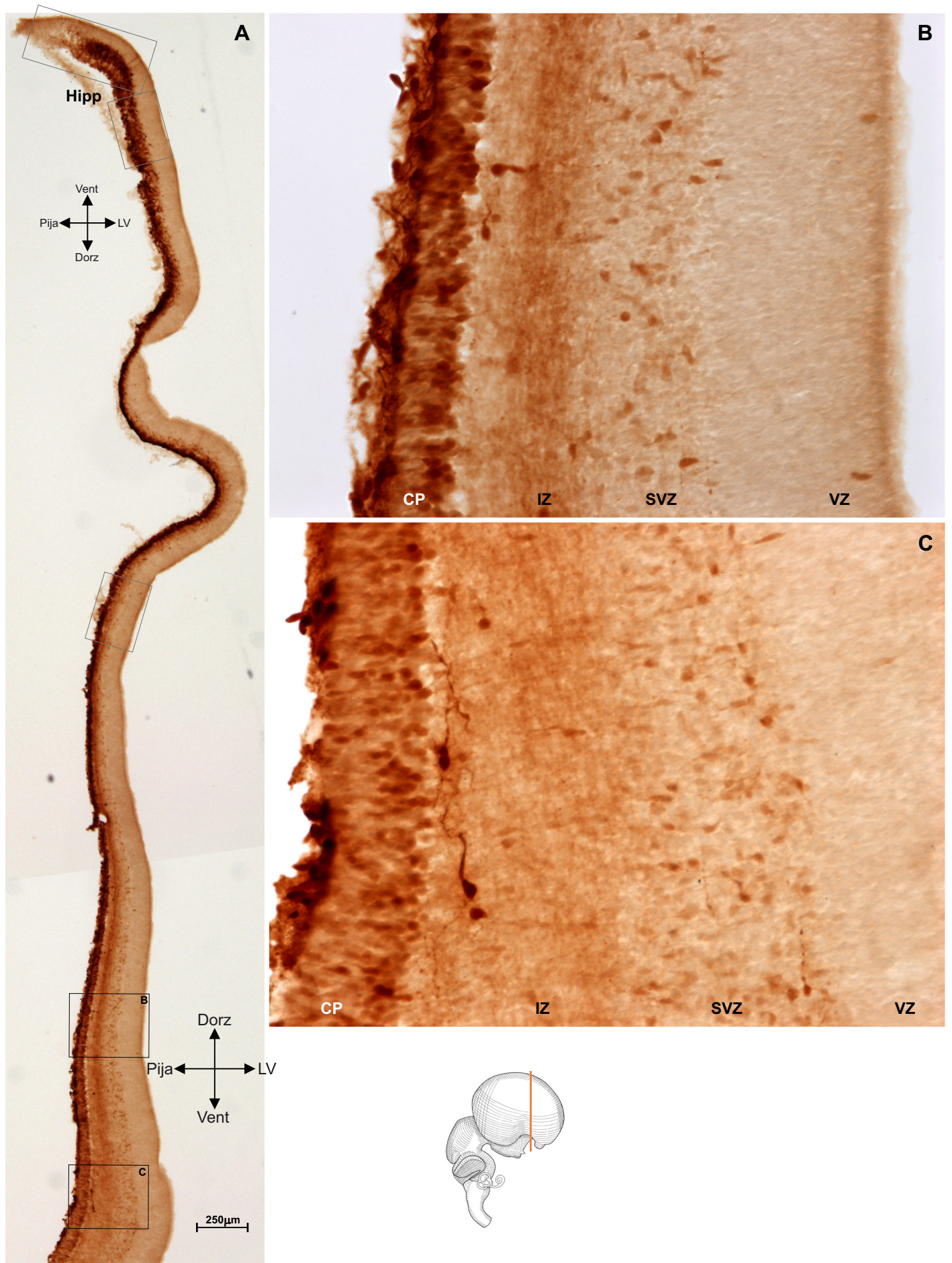
**Slika 5.28** Majmun E48, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalretinin.



pozitivne stanice iz ganglijskog brežuljka usmjerene prema lateralnoj stijenci telencefalona, a samo manjim dijelom idu prema bazalnom dijelu (isprekidane strelice). Također, u medijalnom dijelu, od ganglijskog brežuljka prema ventralno nalazi se sloj intenzivno reaktivnih stanica koji se nastavlja prema bazalno u marginalnu zonu i dorzalno prema ventrikularnoj zoni koja se nastavlja u koroidni splet. Također, u dorzalnom dijelu vidljive su pojedinačne kalretininske stanice koje ulaze u marginalnu zonu kroz površinu hipokampusa (zvjezdica). Ovaj tanak medijalni dio telencefaličkog zida, kao i tanka ventrikularna zona koja se proteže od njega prema ganglijskom brežuljku, sadrži Mash1 pozitivne stanice (slika 5.slika 5.23A). U dorzalnim dijelovima lateralnog telencefaličkog zida cjelokupna kortikalna ploča sadrži gusto poredane srednje intenzivno reaktivne kalretininske stanice. Ovaj sloj se polako u medijalnom telencefaličkom zidu zadebljava, a u području budućeg hipokampusa razdvaja se u dvije zone.

**Slika 5.29** Majmun E48, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalretinin. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli B i C.

Panel A prikazuje stijenku palijuma od lateralno (odozdo) prema dorzalno i medijalno (gore) gdje je smješten dorzalni hipokampus. Uvećani dio na panelu B prikazuje središnji dio neopalijuma (lateralnog telencefaličkog zida). U ovom dijelu vidljiva je specifična distribucija kalretinin reaktivnih stanica. U marginalnoj zoni nalaze se gusto poredane stanice intenzivne reaktivnosti, relativno velikog tijela i horizontalno poredanih nastavaka. Ispod njih se nalazi kortikalna ploča koja se sastoji od 8 do 10 redova stanica piriformnog ili bipolarnog oblika okrenutih s vrhom prema pijalnoj površini. Većina stanica koje tvore donja 3-4 reda pokazuju blagu do srednje jaku kalretininsku reaktivnost što ukazuje kako je u ovom području započelo razdvajanje kalretininske ploče. Između kortikalne ploče i subventrikularne zone mogu se uočiti dva sloja u kojem se vidi kalretininska reaktivnost u neuropilu. U gornjoj je polovici ta reaktivnost nešto manja, ali se sporadično uočavaju intenzivno reaktivni i diferencirani neuroni. U donjem je dijelu reaktivnost neuropila jača i odaje dojam horizontalne orijentacije. Unutar toga uočavaju se slabije reaktivne stanice. U subventrikularnoj i ventrikularnoj zoni nema reaktivnosti neuropila, ali se u subventrikularnoj zoni nalazi dosta kalretininskih stanica slabe do srednje intenzivne reaktivnosti. Ovaj obrazac ukazuje kako stanice u subventrikularnoj zoni postaju reaktivnije. Uz ventrikularnu zonu sporadično se mogu uočiti srednje intenzivno reaktivne kalretininske stanice. Uvećani dio na panelu C odgovara ventralnom dijelu neopalijuma. Vidljiv je sličan obrazac kalretininske reaktivnosti kao i na panelu prije, uz deblju kortikalnu ploču i ostale slojeve. U sloju ispod kortikalne ploče i u intermedijalnoj zoni vidi se reaktivnost neuropila, a ovdje se mogu uočiti i brojne radijalno orijentirane slabo reaktivne kalretininske stanice. Neposredno ispod kortikalne ploče mogu se zapaziti horizontalno orijentirane stanice s relativno velikim tijelom i jednim izraženim nastavkom, slične morfologije kao i stanice marginalne zone. Ove horizontalne stanice imaju dobro razgranat tanak nastavak s proširenjima koji najvjerojatnije odgovara aksonu. U marginalnoj zoni vidljive su gusto poredane intenzivno reaktivne kalretininske stanice. Ove stanice, uz veliko horizontalno položeno tijelo, imaju unipolarnu morfologiju s intenzivno reaktivnim horizontalno položenim nastavkom, dajući dojam stanica koje su započele s diferencijacijom. Ovakva morfologija odgovara ranim Cajal-Retziusovim stanicama koje prevladavaju u marginalnoj zoni. Kroz kortikalnu ploču se mogu zapaziti i pojedinačne kalretinin pozitivne stanice slične orijentacije, dajući dojam da se radi o migratornim stanicama.



**Slika 5.29** Majmun E48, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalretinin. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli B i C.

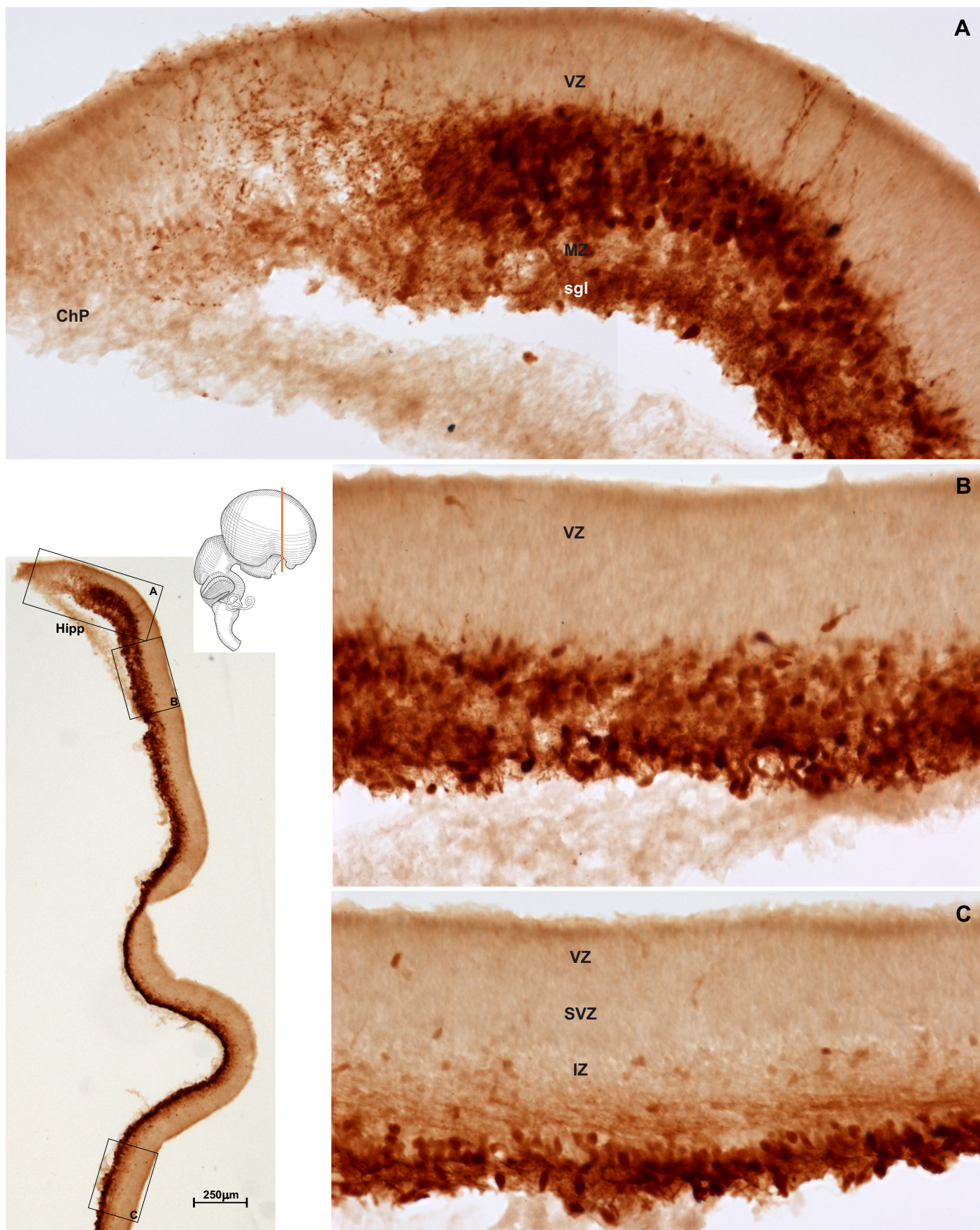
**Slika 5.30** Majmun E48, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalretinin. Paneli A-C prikazuju uvećane dijelove presjeka prikazanog na slici 5.29A, a točne pozicije prikaza označene su pravokutnicima na umanjenom presjeku reza.

U hipokampusu dominira debela hipokampalna ploča koja ispunjava središnju trećinu stijenke i koju tvore gusto poredani intenzivno reaktivni kalretininski neuroni (A). Površnije od hipokampalne ploče subpikalno se nalazi sloj kojeg tvore gusto poredane, ali nešto manje reaktivne stanice, a koji je od hipokampalne ploče odvojen tankim slojem bez intenzivno reaktivnih stanica. U području prema koroidnom spletu odlaze tanki nastavci nalik aksonu koji tvore mrežu i završavaju na dnu ventrikularne zone. Pojedinačno se ovakvi izdanci mogu vidjeti i u drugim dijelovima hipokampusa. Panel B prikazuje dio medijalne stijenke koji se dorzalno nastavlja na hipokampus. Vidljivo je kako ovdje nema razdvajanja kalretininske ploče te da je ona u dijelu budućeg arhipalijuma deblja nego u susjednim neopalijalnim područjima (slika 5.slika 5.29B) i zahvaća gotovo polovicu telencefaličkog zida. Panel C zahvaća najdorzalniji dio neopalijuma (vrh telencefaličkog mjehurića). Vidljivo je kako kalretininska ploča nije razdvojena te je u odnosu na arhipalijum tanja i zahvaća gornju četvrtinu stijenke. Uglavnom je sastavljena od visoko reaktivnih stanica, što odgovara gornjem dijelu arhipalijalne kalretininske ploče. Samo u dubljem dijelu uočljive su srednje reaktivni stanice, a ispod kalretininske ploče vide se horizontalni nastavci i blago reaktivna tijela koja mogu odgovarati tangencijalno migrirajućim stanicama koje postaju kalretinin reaktivne. Pojedinačne slabo reaktivne kalretininske stanice mogu se vidjeti i u intermedijalnoj zoni.

**Slika 5.31** Majmun E48, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalretinin. Paneli A-C prikazuju uvećane dijelove presjeka prikazanog na slici 5.28C, a točne pozicije prikaza označene su pravokutnicima na umanjenom presjeku reza.

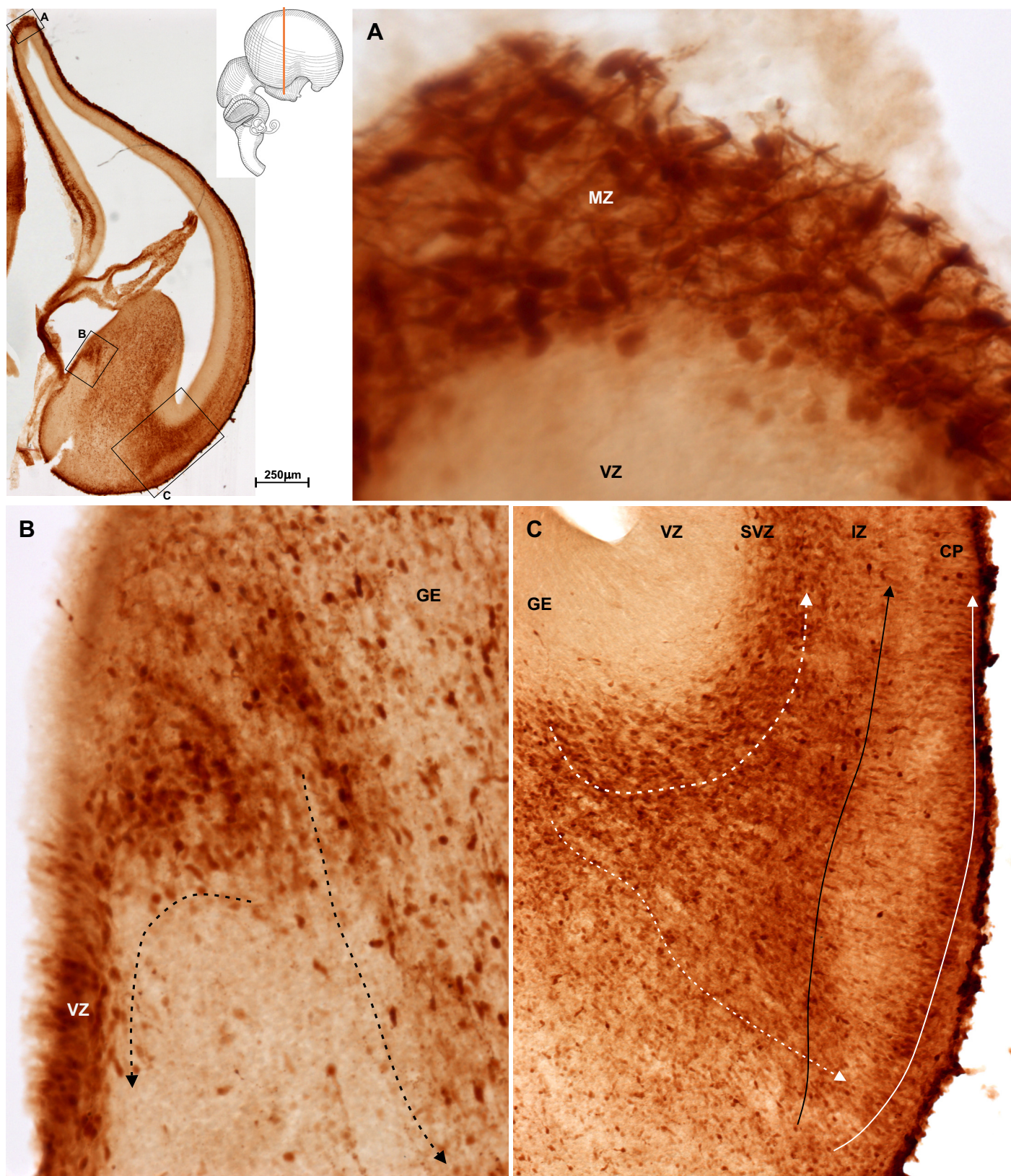
U kaudalnom dijelu telencefalona u području vrha dorzalnog telencefaličkog mjehurića (A) vide se brojne gusto poredane, unipolarne, intenzivno reaktivne stanice s relativno velikim tijelom u marginalnoj zoni, koje morfologijom odgovaraju ranim Cajal-Retziusovim stanicama. Panel B prikazuje područje gdje se ganglijski brežuljak nastavlja prema proliferativnoj zoni koroidnog spleta te pokazuje intenzivnu kalretininsku reaktivnost. U ovom dijelu može se uočiti Mash1 reaktivnost (slika 5.slika 5.23A). Iz ovog graničnog dijela stanice su usmjerene prema medijalnom dijelu bazalnog telencefalona (isprekidane strelice). Panel C prikazuje prijelaz ganglijskog brežuljka u lateralni telencefalički zid. Vidljivo je kako većina kalretininskih stanica koje napuštaju ganglijski brežuljak kroz lateralni migratorni put ulaze tangencijalno u subventrikularnu zonu, a samo su manjim dijelom usmjerene ventro-medijalno prema bazalnom telencefalonu (isprekidane strelice). Iz bazalnog telencefalona





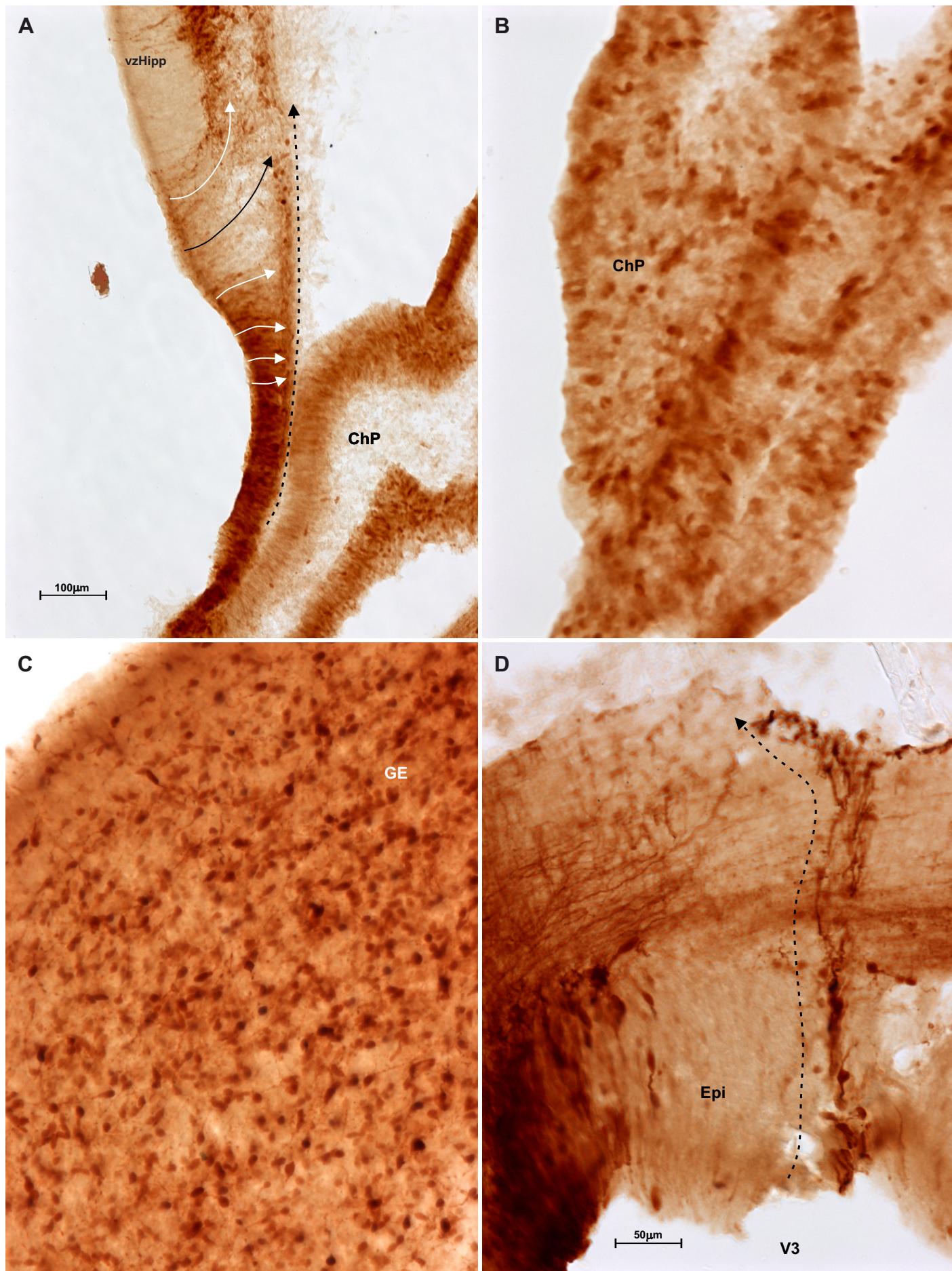
**Slika 5.30** Majmun E48, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalretinin. Paneli A-C prikazuju uvećane dijelove presjeka prikazanog na slici 5.29A, a točne pozicije prikaza označene su pravokutnicima na umanjenom presjeku reza.





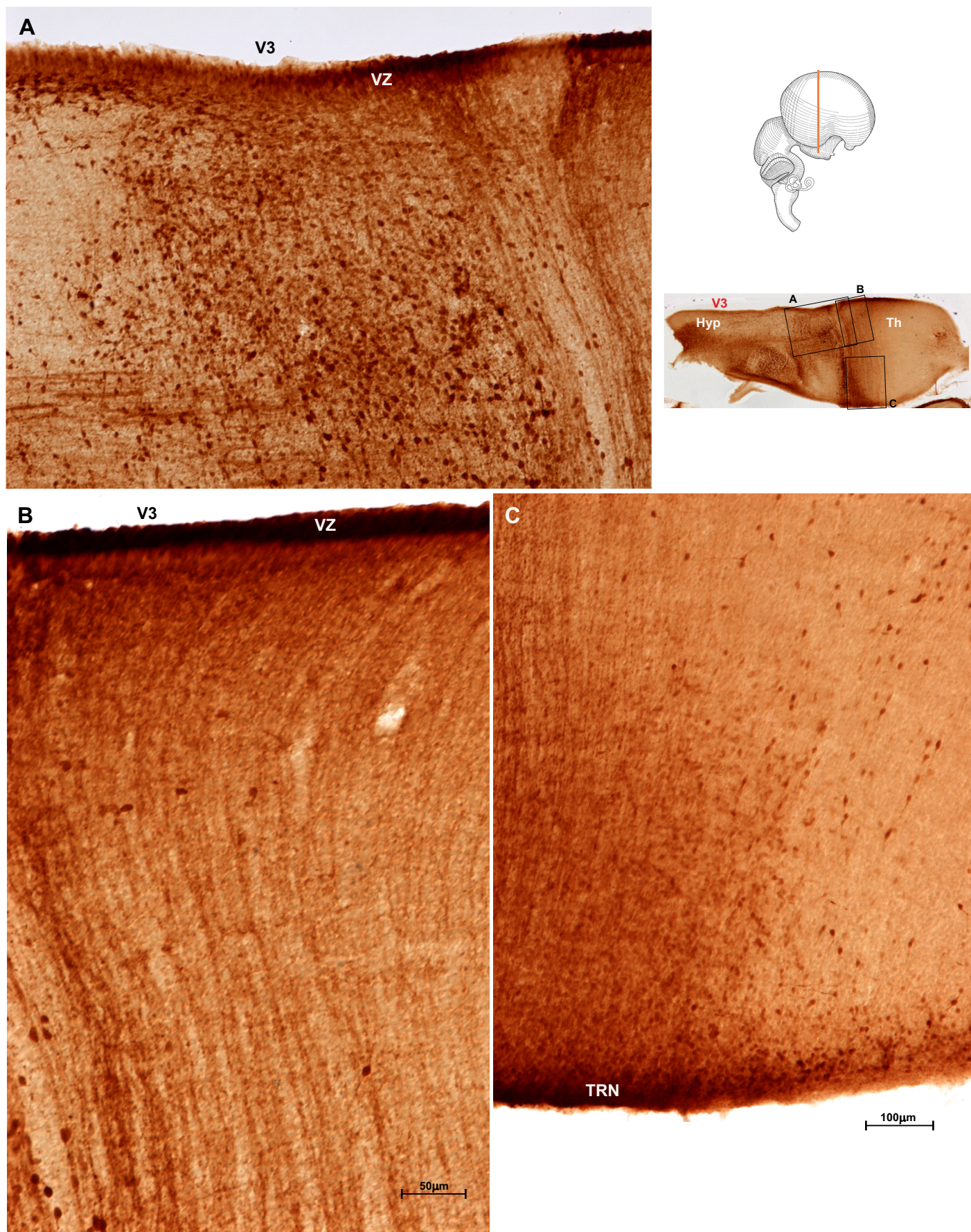
**Slika 5.31** Majmun E48, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalretinin. Paneli A-C prikazuju uvećane dijelove presjeka prikazanog na slici 5.28C, a točne pozicije prikaza označene su pravokutnicima na umanjenom presjeku reza.





**Slika 5.32** Majmun E48, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalretinin.





**Slika 5.33** Majmun E48, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalretinin.



stanice su usmjerene dijelom kroz sloj neposredno ispod kortikalne ploče (crna strelica) te kroz marginalnu zonu (bijela strelica) prema dorzalnog telencefalonu.

**Slika 5.32** Majmun E48, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalretinin.

Panel A prikazuje područje medijalnog telencefaličkog zida u kojem je vidljiva intenzivno kalretinin reaktivna proliferativna zona koja se proteže od hipokampusu prema ventralno, odnosno prema koroidnom spletu (isprekidane strelice). Od ove se zone vide pojedinačni neuroni koji se nastavljaju subprijalno prema hipokampusu (strelice). Također, unutar koroidnog spleta vide se brojne kalretinin pozitivne stanice (B), koje su slične morfologije i jednako gusto poredane kao i kalretininske stanice u središnjem dijelu ganglijskog brežuljka, posebice u subventrikularnoj zoni (C). Unipolarna morfologija ovih stanica ukazuje da se radi o migratornim stanicama. Zanimljivo je da se i u području vrha diencefalona (D) može uočiti proliferativna zona iz koje odlaze u lancu poredane radijalno orijentirane kalretininske stanice da bi se zatim na površini usmjerile tangencijalno.

**Slika 5.33** Majmun E48, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalretinin.

Brojne kalretininske stanice vidljive su u području talamusa i hipotalamusa. Ventrikularna zona sadrži stanice s izrazito visokom stupnjem kalretininske reaktivnosti. Brojne stanice migratorne morfologije nalaze se u subventrikularnoj zoni, ali također pokazuju orijentaciju prema ventrolateralnom dijelu talamusa (A). Od ventralnog dijela ventrikularne zone talamusa prema lateralnoj površini kalretininske stanice poredane su u tračcima (B). Postoji gradijent u broju u stupnju reaktivnosti koji ide od ventrikularne zone do lateralne površine talamusa. Kalretinin reaktivne stanice migratorne morfologije i jače reaktivnosti mogu se zapaziti kroz talamus. Na lateralnoj površini talamusa vide se stanice koje će oblikovati retikularnu i periretikularnu jezgru (C).

### 5.1.2.3 Porijeklo i putevi migracije GABA-ergičkih neurona

Rezovi majmuskog mozga u stadiju E48 imunohistokemijski su obrađeni markerima GABA-ergičkih neurona: GAD65 i GAD67. U telencefaličkim neuronima koji su na višem stupnju maturacije i razvili su već funkcionalne aksonske projekcije, GAD67 je više nakupljen u tijelima neurona, dok je GAD65 nakupljen u aksonima i aksonskim proširenjima. Stoga većina telencefaličkih i diencefaličkih neurona ima vidljivu razinu GAD67 u tijelima, a GAD65 u aksonu i aksonskim proširenjima. Ovdje treba spomenuti kako u nekim dijelovima odraslog diencefalona i telencefalona manji dio neurona pokazuje intenzivniju GAD65 reaktivnost u tijelima nego GAD67.

U ovom istraživanju analizirani je dio arhivskog histološkog materijala iz istraživanja (Petanjek et al., 2009a) koje je pokazalo da u telencefalonu majmuna tijekom razvoja stanice u GABA-ergičkim proliferativnim zonama, kao i stanice migratorne morfologije (ovalne, unipolarne) koje napuštaju ganglijski brežuljak i ulaze u lateralnu stijenu, imaju već prisutnu ekspresiju GAD65, dok je ekspresija GAD67 bila jasno izražena samo u područjima gdje se pojavljuju prvi diferencirani neuroni (marginalna i zona pod pločom). U tom istraživanju korišteno je poliklonalno protutijelo koje je u ranijim fetalnim stadijima imalo dosta intenzivno pozadinsko bojenje, dok je u ovom istraživanju korišteno GAD67 monoklonalno protutijelo. Korištenjem ovog protutijela pokazalo se kako je i GAD67 prisutan u migratornim, pa čak i proliferativnim stanicama. Usporedba ekspresije monoklonalnog GAD67 i GAD65 protutijela pokazala je kako progenitori i rane migratorne stanice u području diencefalona te u dijelu proliferativnih zona bazalnog telencefalona pokazuju visoku razinu ekspresije oba enzima.

U proliferativnim zonama telencefalona uglavnom dominira GAD65 reaktivnost. Ona je prisutna u okruglim stanicama ganglijskog i septalnog brežuljka te preoptičkog područja. Ove stanice su intenzivno reaktivne i gusto zbijene u subventrikularnoj zoni, dok se u ventrikularnoj zoni sporadično nalaze GAD65 reaktivne stanice. Ovakav raspored stanica daje dojam da se u ovom stadiju proliferativne stanice ventrikularne zone dijele te formiraju GAD65 pozitivne stanice subventrikularne zone (slika 5.34A). Stanice ne pokazuju jasno vidljivu razinu ekspresije GAD67, izuzev u spojnem dijelu medijalnog i lateralnog ganglijskog brežuljka (slika 5.36A). Obrazac istodobne GAD65 i GAD67 reaktivnosti u subventrikularnoj zoni i ranim migratornim stanicama vidljiv je i u talamičkim i hipotalamičkim proliferativnim zonama. Kaudalnije u telencefalonu vidljiva je GAD67 reaktivnost u stanicama bazo-lateralne proliferativne zone koja se proteže od ganglijskog brežuljka prema ventralno (slika 5.41A), kao i subventrikularno u rostro-dorzalnom dijelu medijalnog zida u području prijelaza arhipalijuma prema neopalijumu, oko osnove komisuralne ploče (slika 5.35A). Iz oba ova područja vidljivo je kako migratorne stanice odlaze prema marginalnoj zoni (slika 5.35B i

5.41D). Također, iz bazo-lateralne proliferativne zone stanice se lateralno, osim u marginalnu zone, šire i u sloj ispod kortikalne ploče (slika 5.36D). Broj i gustoća GAD67 pozitivnih stanica u sloju ispod kortikalne ploče veća je nego rostralno (slika 5.34B), što ukazuje da GAD67 pozitivne stanice bazalnog dijela telencefalona imaju kaudalnije porijeklo.

Rostralnije je vidljiva svjetlija GAD65 reaktivnosti iznad subventrikularne zone ganglijskog brežuljka (slika 5.34A). Kako se GAD65 brzo redistribuira prema nastavcima, zapažena smanjena reaktivnost odgovara migratornim stanicama koje su napustile subventrikularnu zonu. GAD65 migratorne stanice iz ganglijskog brežuljka većinom su usmjerene u gornji dio subventrikularne zone lateralnog telencefaličkog zida (slika 5.34C) gdje oblikuju relativno gusto poredani niz. Većina septalnog dijela medijalnog zida gusto je ispunjena GAD65 reaktivnim stanicama među kojima dominiraju stanice migratorne morfologije. U dijelu septuma stanice čine kontinuitet od proliferativnih zona prema subpijalno (slika 5.35A). Kako se subpijalna reaktivnost ne nastavlja prema bazalno (slika 5.37A), najvjerojatnije se radi o migraciji prema rostralno i dorzalno. Kako u septalnom dijelu nije pokazana intenzivna GAD67 reaktivnosti kao u rostro-dorzalnom dijelu medijalnog zida, nejasno je postoji li kontinuitet između ove dvije proliferativne zone.

U diencefalonu od GAD65 i GAD67 reaktivnih zona talamusa stanice u radijalnom slijedu migriraju prema lateralnom zidu gdje se grupiraju i formiraju retikularnu jezgru (slika 5.38 i 5.40). Unutar samog talamusa nema većeg nakupljanja GAD pozitivnih stanica, a sporadično su vidljive stanice migratorne morfologije. Nasuprot talamusu, hipotalamus je ispunjen velikim brojem GAD65 i GAD67 reaktivnih stanica koje se usmjeravaju prema bazalno te tvore gusti sloj ispod pije koji je u kontinuitetu s bazalnim telencefalonom. Dojam je da u bazalnom telencefalonu GAD67 pokazuje intenzivniju reaktivnost u odnosu na GAD65, a u kaudalnim dijelovima je medio-bazalno prisutna samo GAD67 reaktivnost. Ona odgovara migratornim stanicama koje dolaze iz GAD67 reaktivnih proliferativnih zona koje se nalaze u ventralnom dijelu medijalnog, ali i lateralnog telencefaličkog zida koji se proteže do kaudalnog ganglijskog brežuljka.

U strijatumu nema GAD67 reaktivnosti, ali je reaktivnost na GAD65 ravnomjerno raspoređena (slika 5.37). Čini se da u području strijatuma i bazalnog telencefalona, osim gusto zbijenih stanica postoji i bojenje neuropila odnosno aksona koji su u kontinuitetu s hipotalamusom. Kroz cijeli talamus vide se brojni aksoni koji idu od hipotalamusa kroz lateralne dvije trećine talamusa prema dorzalno gdje oblikuju debeli snop koji prelazi s jedne na drugu stranu u krovu treće moždane komore. To je posebno izraženo u kaudalnom dijelu. Uz samu lateralnu površinu diencefalona proteže se relativno tanak, ali vrlo intenzivno reaktivan snop s gusto poredanim aksonima koji ide dorzalno kroz cijeli epitalamus, a prema ventralno se nastavlja u površni dio hipotalamusa i bazalnog telencefalona te dalje u



marginalnu zonu palijuma. Izvor ovih aksona mogu biti stanice buduće retikularne jezgre, od kojih aksonske projekcije odlaze i prema proliferativnoj zoni ventralnog talamusa.

Kod korištenog poliklalnog somatostatinskog protutijela u ovim ranim fetalnim stadijima vidljiva je somatostatinska reaktivnost oko krvnih žila, kao i unutar mezenhimskih struktura, što uključuje mezenhimne (mikroglijalne) stanice kroz tkivo te koroidni splet i piju. To ukazuje na moguća nespecifična vezanja. Budući da se ovakav obrazac bojenja dijelom gubi u kasnijim stadijima, ovdje će se pružiti opis obilježja koja jasno ukazuju da se radi o specifičnom bojenju kao i onih obilježja koja nisu zapažena u kasnijim stadijima koristeći ovo protutijelo ili druga poliklalna protutijela.

Srednje intenzivno reaktivne somatostatinske stanice gusto su poredane u zoni koja se nalazi iznad proliferativnih zona ganglijskog brežuljka (slika 5.42) i koja je na Nissl bojenjima vidljiva kao svjetlija zona iznad subventrikularne te zona u kojoj se samo u dijelu koji graniči sa subventrikularnom mogu zapaziti slabo do srednje intenzivno reaktivne Mash1 stanice. Masa ovih somatostatinskih stanica usmjerena je ventralno prema bazalnom telencefalonu gdje je njihova najveća gustoća. Ovdje se mogu vidjeti i diferencirane intenzivno reaktivne stanice. Diferencirane stanice se mogu povremeno zamijetiti i u lateralnom telencefaličkom zidu, prvenstveno ispod kortikalne ploče i u intermedijalnoj zoni. Također, sporadično se mogu zamijetiti i stanice migratorne morfologije (slika 5.43). Ono što je zanimljivo je da se često mogu zamijetiti i stanice čiji su nastavci u dodiru s krvnim žilama. U hipokampusu nisu jasno uočene reaktivne stanice, ali zbog intenzivnog bojenja neuropila i mezenhimskih stanica ovo zapažanje treba uzeti uvjetno. Treba spomenuti da se u samom ventro-lateralnom dijelu telencefalona u području gdje je najrazvijenija kortikalna ploča može zapaziti sloj srednje reaktivnih stanica s tipičnim intenzivnim nakupljanjem somatostatina u jednom dijelu citoplazme tijela i nastavka.

U proliferativnim zonama ganglijskog brežuljka i lateralnog telencefalona nema reaktivnih somatostatinskih stanica, ali su gusto poredane intenzivno reaktivne stanice vidljive rostralno na spoju lateralnog i medijalnog ganglijskog brežuljka (slika 5.44), a u kaudalnom dijelu u proliferativnoj zoni koja se od ganglijskog brežuljka proteže prema ventralnom dijelu telencefalona i početku medijalnog telencefaličkog zida (slika 5.45).

U bazalnom dijelu telencefalona i medijalno prema hipotalamusu, uz gusto poredane somatostatin reaktivne stanice vidljiva je intenzivna reaktivnost neuropila, koja najvjerojatnije odgovara somatostatin reaktivnim vlaknima. U bazalnom dijelu telencefalona ova reaktivnost (koja se isprepliće i sa somatostatin reaktivnim neuronima) prisutna je od same pije do 300-350µm dubine, dok je u lateralnom telencefalonu ona prisutna kroz intermedijalnu, a posebno je intenzivna neposredno ispod kortikalne ploče. U tom dijelu reaktivnost vlakana intenzivnija je od reaktivnosti u bazalnom telencefalonu, i od zone koja je na najventralnijem djelu kortikalne ploče debljine do 100µm se progresivno stanjuje i nestaje u dorzalnom dijelu

lateralno telencefalona. Međutim, u medijalnom telencefaličkom zidu reaktivnost u neuropilu se ponovo pojavljuje ispod kortikalne ploče i proširuje od dorzalno prema ventralno, protežući se od pije pa sve do proliferativnih zona u većem dijelu medijalnog telencefaličkog zida.

U talamusu, tanak snop intenzivno reaktivnih vlakana vidljiv je u samom dorzo-lateralnom dijelu blizu, ali ne uz samu površinu. Ova reaktivnost se širi u samom dorzalnom vrhu talamusa i prema epitalamusu, a difuzna reaktivnost prisutna je i na granici hipotalamusa i talamus (ili se tu rasipau ili se tu spajaju, ili je zapravo ova somatostatinska reaktivnost od neurona retikularne i periretikularne jezgre i ide dorzalno i ventralno). U hipotalamusu se u medijalnom dijelu vidi reaktivnost u snopovima, a koja se zatim kondenzira i proteže prema dorzalno kroz talamus u epitalamus. Ova reaktivnost je u talamusu prisutna na udaljenosti 300-350 $\mu$ m od medijalne površine. U ovom dijelu žilni crtež se mijenja, i u sloju uz površinu je više mrežolikog oblika, a ovdje žile postaju usmjerene okomito prema površini.

## Deskriptivna analiza GAD65, GAD67 i somatostatinskih rezova

**Slika 5.34** Majmun E48, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD65 (A, C) i GAD67 (B, D). Pravokutnici označeni na panelima A i B uvećano su prikazani kao paneli C i D.

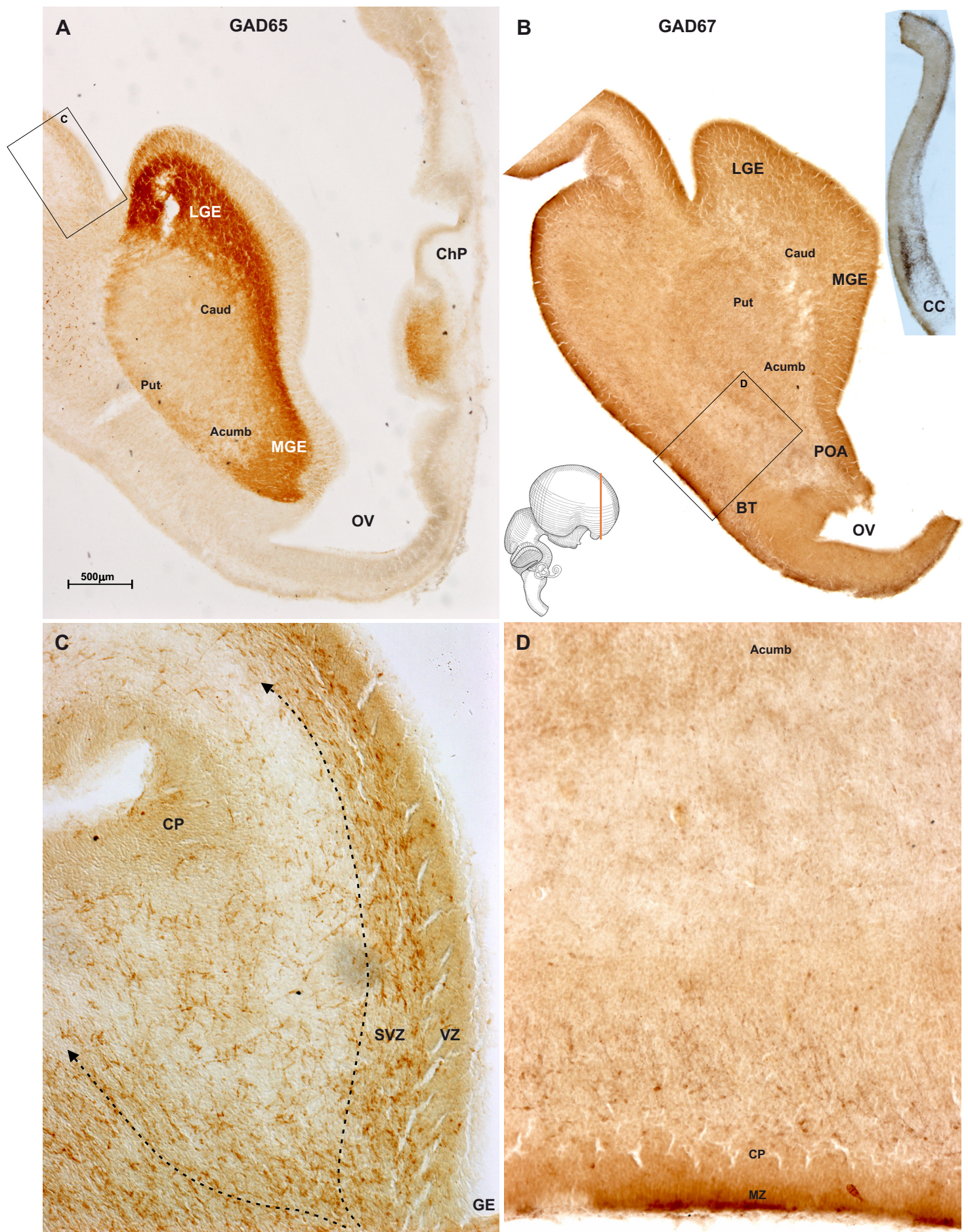
Panel A prikazuje presjek kroz frontalni režanj neposredno ispred olfaktornog neuroepitela i septuma. U subventrikularnoj zoni ganglijskog brežuljka vidljive su gusto zbijene, ovalne, intenzivno reaktivne GAD65 pozitivne stanice. Slabija, ali difuzna reaktivnost koja je ravnomjerno raspodijeljena vidljiva je i u strijatumu. Područje između subventrikularne zone i strijatuma pokazuje slabiju GAD65 reaktivnost te odgovara zoni gdje prestaje Mash1 reaktivnost (slika 5.22C i 5.18B). Ova se zona nastavlja u lateralni migratorni put (engl. *lateral migratory stream*) koji čine stanice koje napuštaju ganglijski brežuljak te su usmjerene prema lateralnom zidu, a dijelom i prema bazalno (isprekidane strelice, C). U ventrikularnoj zoni ganglijskog brežuljka sporadično se nalaze GAD65 reaktivne stanice te ona u ovom stadiju na manjem povećanju ne izgleda reaktivno. U manjem dijelu medijalnog zida, odnosno u području neposredno ispred ganglijskog brežuljka koje je vezano uz spoj sa koroidnim spletom i komisuralnom pločom, vidljiv je sličan obrazac reaktivnosti kao u ganglijskom brežuljku. Od ovoga dijela ne mogu se zapaziti migratorne stanice koje odlaze u dorzalni telencefalon kroz medijalni telencefalički zid.

Na panelu B vidljivo je da u ganglijskom brežuljku nema GAD67 reaktivnosti, ali se određen broj GAD67 reaktivnih stanica može uočiti u bazalnom dijelu, ispod kortikalne ploče (D). Nakupljanje GAD67 intenzivno reaktivnih stanica vidljivo je i iznad ventrikularne zone u rostralnom dijelu dorzo-medijalnog zida, oko osnove komisuralne ploče (umetak).

**Slika 5.35** Majmun E48, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD67 (A, B) i GAD65 (C, D). Pravokutnik označen na panelu A uvećano je prikazan kao panel B. Panel C prikazuje uvećani dio presjeka prikazanog na slici 5.34.A, a točna pozicija prikaza označena je pravokutnikom na umanjenom presjeku reza.

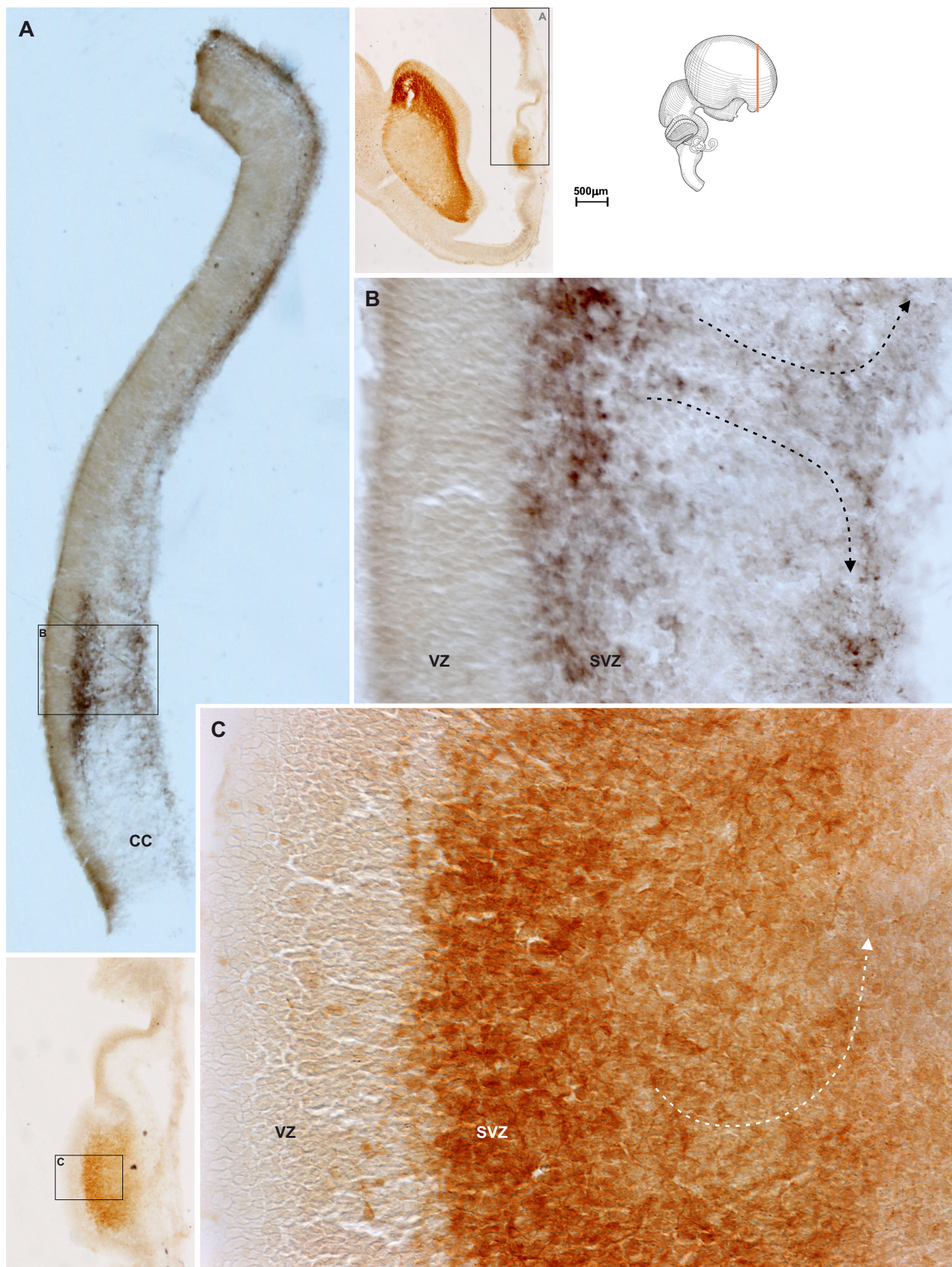
Rostralni dio dorzo-medijalnog zida, oko osnove komisuralne ploče, prikazan na panelu A odgovara pravokutniku prikazanom na umanjenom presjeku susjednog reza (slika 5.34A) obrađenog imunohistokemijski na GAD65. Vidljive su GAD67 intenzivno reaktivne stanice koje se nakupljaju iznad ventrikularne zone te odlaze prema površini gdje se subpijalno smještaju te čine horizontalne nakupine stanica (isprekidane strelice, B). U ovom subpijalnom dijelu vide se i tanki nastavci s proširenjima koja mogu odgovarati aksonima. U odgovarajućem području na kaudalnijem susjednom rezu (C) vidljive su brojne gusto poredane, vrlo intenzivno GAD65 reaktivne stanice u subventrikularnoj zoni. Od





**Slika 5.34** Majmun E48, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD65 (A, C) i GAD67 (B, D). Pravokutnici označeni na panelima A i B uvećano su prikazani kao paneli C i D.





**Slika 5.35** Majmun E48, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD67 (A, B) i GAD65 (C, D). Pravokutnici označeni na panelima A i B uvećano su prikazani kao paneli C i D.

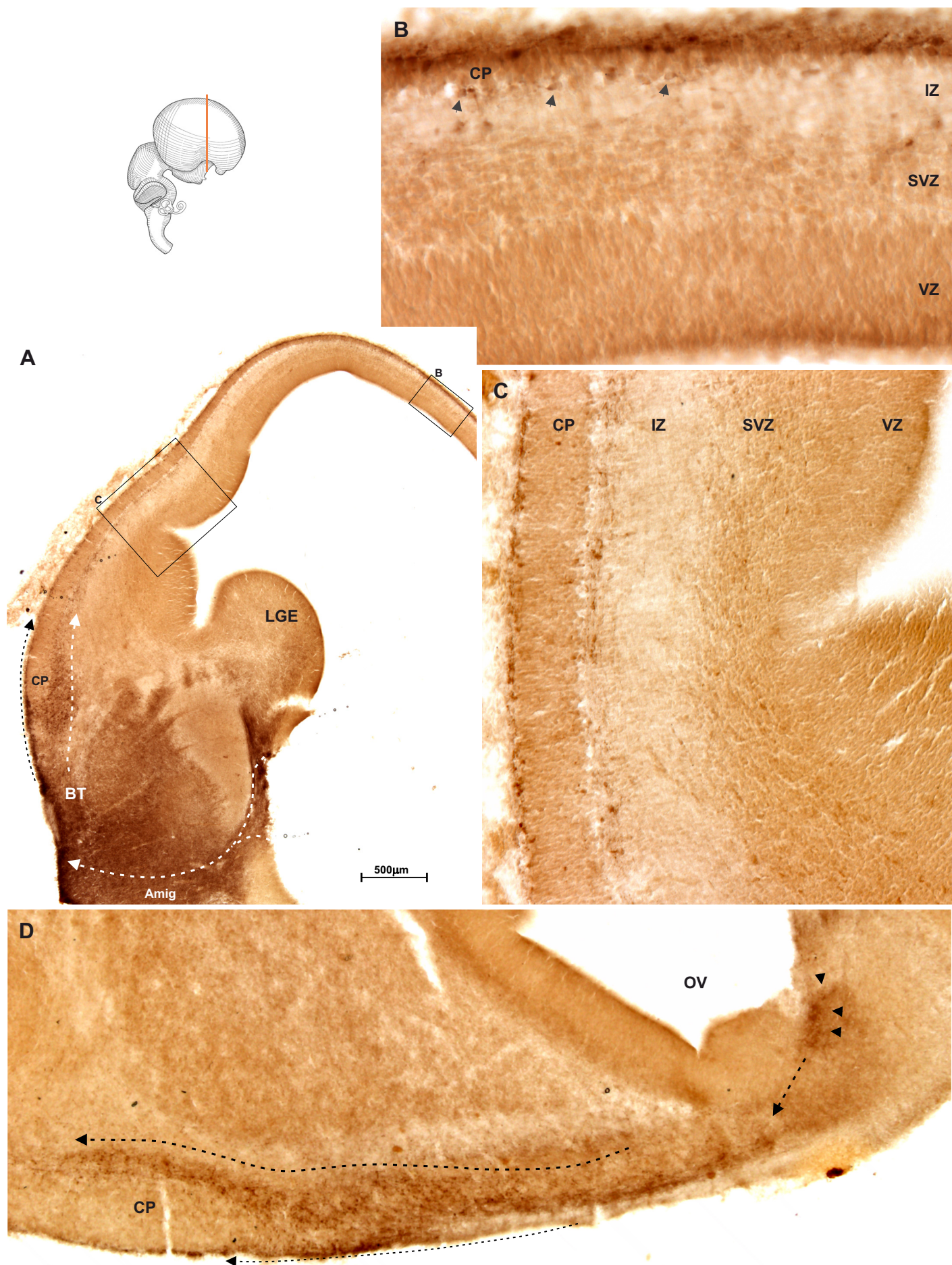
subventrikularne zone prema površini vidljiv je sve manji intenzitet reaktivnosti, dok se u ventrikularnoj zoni samo sporadično nalaze GAD65 reaktivne stanice.

**Slika 5.36** Majmun E48, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD67. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli B i C. Panel D prikazuje uvećani dio bazalnog telencefalona koji pripada susjednom kaudalnijem rezu.

Panel A prikazuje presjek kroz rostralni dio bazalnog telencefalona i amigdala koje pokazuje intenzivnu GAD67 reaktivnost. Na presjeku (D) u razini septuma i kaudalnog završetka olfaktornog neuroepitela koji se nalazi ispod završetka paleokortikalnog ventrikula, u bazalnom dijelu vidljivo je gomilanje GAD67 pozitivnih stanica u zoni 200-300 $\mu$ m debljine (D), dok se bazo-lateralno na mjestu gdje započinje kortikalna ploča ovaj jedinstveni sloj razdvaja u deblji (100 $\mu$ m) sloj ispod kortikalne ploče i tanji dio koji se nastavlja u marginalnu zonu lateralne telencefaličke stijenke (isprekidane strelice, A). Vidljiv je gradijent u debljini koju formiraju ove stanice u sloju ispod kortikalne ploče. Zamjetna reaktivnost na ovom povećanju prisutna je u sloju ispod kortikalne ploče samo u ventralnom dijelu lateralnog telencefaličkog zida (D). Broj i gustoća GAD67 pozitivnih stanica u sloju ispod kortikalne ploče veća je nego rostralno (slika 5.34B), što ukazuje na to da GAD67 pozitivne stanice bazalnog dijela telencefalona imaju kaudalnije porijeklo. Oko proliferativne zone na vrhu paleokortikalnog ventrikula također je vidljiva GAD67 reaktivnost (vrh strelice D). Također, u proliferativnoj zoni koja se nalazi na prijelazu medijalnog u lateralni brežuljak (slika 5.15) vidljiva je intenzivna GAD67 reaktivnost (isprekidana strelica, A).

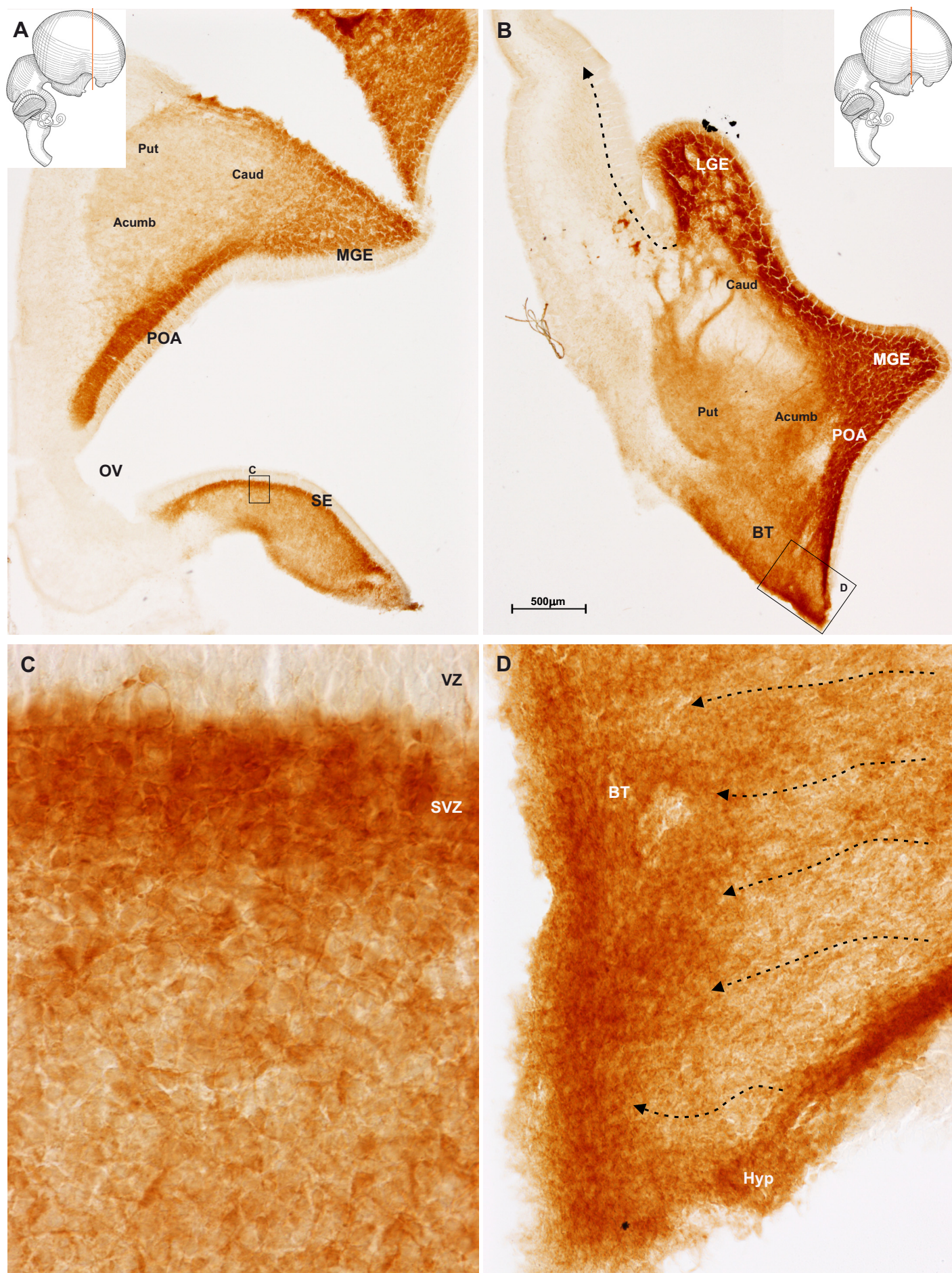
U dorzalnom dijelu lateralnog telencefaličkog zida (B) vidljive su visoko reaktivne stanice marginalne zone koje čine kontinuirani niz te imaju morfologiju i distribuciju sličnu kalretinin pozitivnim stanicama marginalne zone koje se definiraju kao rane Cajal-Retziusove stanice. Od ventralno prema dorzalno progresivno se smanjuje gustoća stanica u sloju ispod kortikalne ploče te u najdorzalnijem dijelu (desno na slici) one u potpunosti nestaju. Također, u sloju ispod kortikalne ploče sporadično se mogu primijetiti GAD67 stanice migratorne morfologije (vrh strelice). U ventralnom dijelu lateralnog telencefaličkog zida (C) vidljiv je niz visoko reaktivnih GAD67 stanica u marginalnoj zoni. Intenzivno reaktivne GAD67 stanice nalaze se i u sloju ispod kortikalne ploče, ali su manje gusto poredane. Vidljivo je također da migratorne stanice u subventrikularnoj zoni pokazuju blagu GAD67 reaktivnost.





**Slika 5.36** Majmun E48, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD67. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli B i C. Panel D prikazuje uvećani dio bazalnog telencefalona sa susjednog kaudalnijeg reza.





**Slika 5.37** Majmun E48, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD65. Pravokutnici označeni na panelima A i B uvećano su prikazani kao paneli C i D.



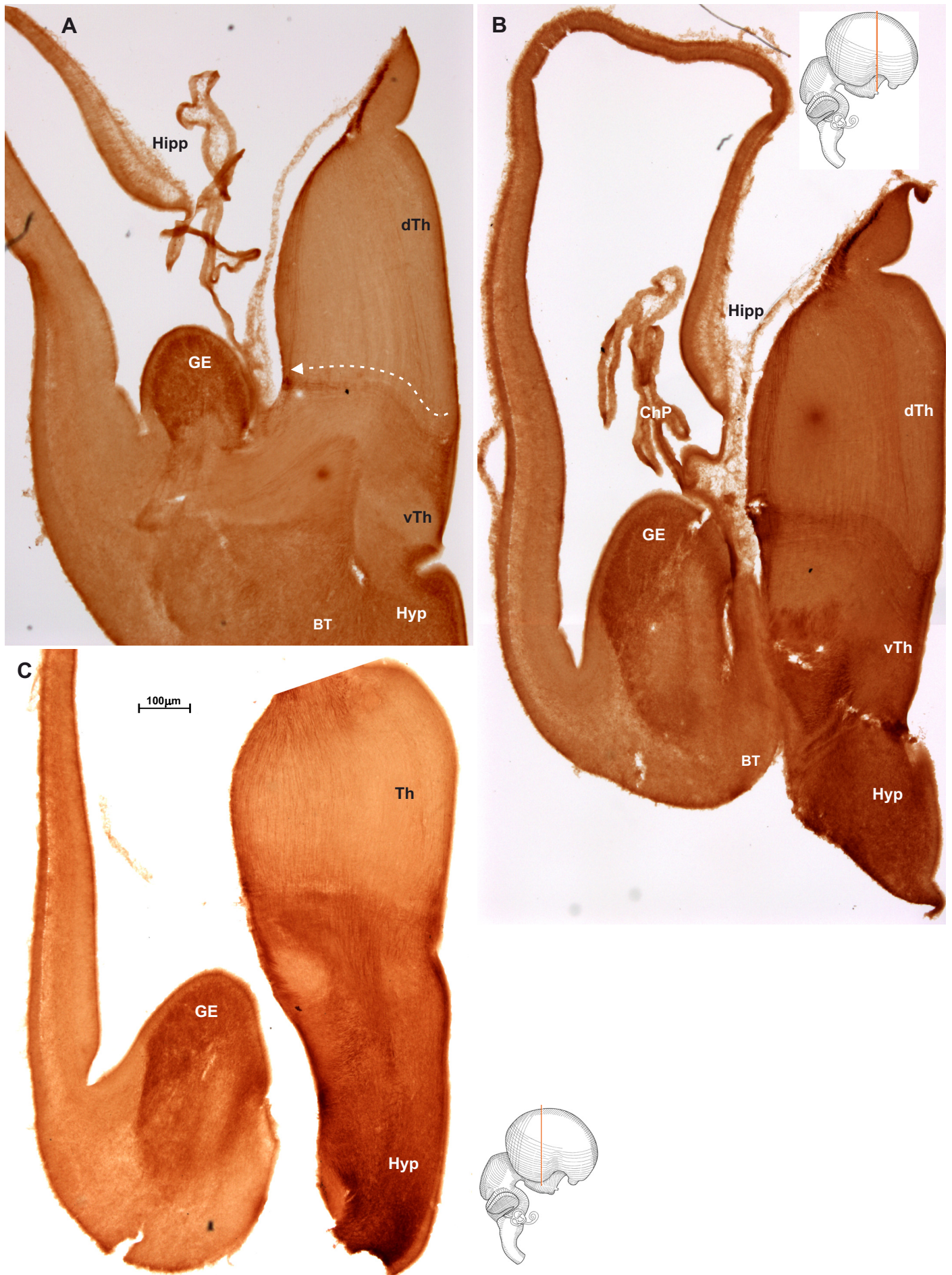
**Slika 5.37** Majmun E48, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD65. Pravokutnici označeni na panelima A i B uvećano su prikazani kao paneli C i D.

Panel A prikazuje presjek u razini septuma i kaudalnog završetka olfaktornog neuroepitela koji se nalazi ispod završetka paleokortikalnog ventrikula. Na ovoj razini striatum je još uvijek jedinstvena struktura. Vidljivo je kako u vrhu paleokortikalnog ventrikula nema GAD65 reaktivnost, što pokazuje da nema strukturnog kontinuiteta između septalnog proliferativnog područja i ganglijskog brežuljka. Intenzivno GAD65 nakupljanje u preoptičkom području pokazuje da ono ima dobro razvijenu subventrikularnu zonu koja debljinom čak premašuje i ventrikularnu. U usporedbi s ganglijskim brežuljkom koji ima nejednoliku debljinu subventrikularne zone, subventrikularna zona preoptičkog područja ravnomjerne je debljine. U području septalnog dijela iznad nereaktivne ventrikularne zone postoji intenzivna GAD65 reaktivnost gusto poredanih okruglih stanicama u subventrikularnoj zoni. Iznad ove zone prema piji vidljive su gusto poredane, ali ipak manje stanice unipolarne morfologije (C).

Panel B prikazuje presjek u razini završetka septuma koji zahvaća i rostro-dorzalni početak talamusa (nije prikazan). Na ovom mjestu proliferativna zona preoptičkog područja prelazi u proliferativnu zonu hipotalamusa. Strijatum je odvojen te se jasno razaznaju putamen, kaudatus i akumbens. Vidljiva je intenzivna GAD65 reaktivnost cjelokupnog bazalnog telencefalona, posebno u površnom dijelu ispod pije. Također, na ovoj razini vidljivo je povećanje intenziteta GAD65 reaktivnosti u subventrikularnoj zoni ganglijskog brežuljka te je ona jasno razgraničena od ventrikularne zone. Iz ganglijskog brežuljka prema lateralnom zidu kroz subventrikularnu zonu vidljive su tangencijalno orijentirane unipolarne GAD65 reaktivne stanice (isprekidane strelice). Intenzivna GAD65 reaktivnost vidljiva je u području prijelaza proliferativne zone preoptičkog područja u proliferativnu zonu hipotalamusa (D). S obzirom na to da su u ovom području stanice ventrikularne zone (slika 5.22D) Mash1 reaktivne, najvjerojatnije se radi o progenitorima koji stvaraju GAD65 intenzivno reaktivne postmitotičke stanice koje se nakupljaju u bazalnom dijelu telencefalona. Kako su GAD65 reaktivne stanice najbrojnije u medijalnom dijelu bazalnog telencefalona, moguće je da se ovdje radi o intenzivnoj migraciji u rostro-kaudalnom smjeru. Bipolarna orijentacija velikog dijela dublje smještenih stanica, u smjeru od proliferativne zone do površine bazalnog telencefalona, ukazuje kako se ovdje radi o migraciji iz proliferativne zone preoptičkog područja i hipotalamusa (isprekidane strelice).

**Slika 5.38** Majmun E48, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD65.

Na presjeku u razini hipotalamusa i prednjeg dijela talamusa (A) vidljiva je najintenzivnija GAD65 reaktivnost u subventrikularnoj zoni ganglijskog brežuljka. Intenzivna reaktivnost prisutna je i kroz gotovo cijelu subventrikularnu zonu hipotalamusa i ventralnog



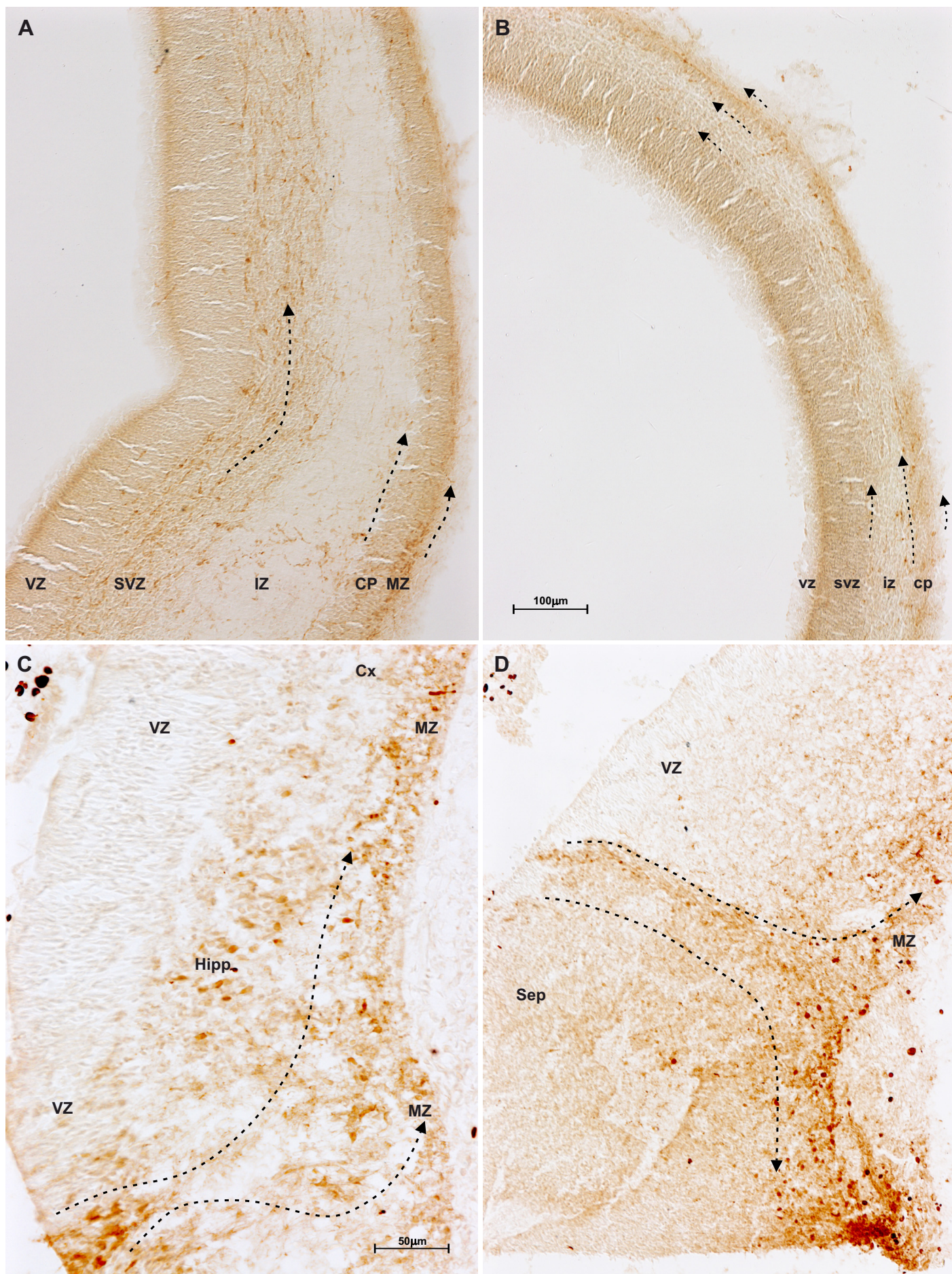
**Slika 5.38** Majmun E48, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD65.

dijela talamusa. Od ventralnog dijela proliferativne zone talamusa vide se tračci sastavljeni od lanaca stanica koji se nakupljaju u sredini lateralne površine talamusa (isprekidana strelica). Na ovom mjestu intenzivna GAD65 reaktivnost posljedica je grupiranja velikog broja stanica koje odgovaraju retikularnoj jezgri. Brojne GAD65 reaktivne stanice nalaze se u dubini hipotalamusa te protežu prema bazalnom telencefalonu. Uz lateralnu površinu talamusa vidljiva su vlakna koja se protežu prema dorzalno u talamus. Na presjeku u razini hipotalamusa i srednjeg dijela talamusa (B) vidljiv je sličan obrazac reaktivnosti kao i na panelu A. U proliferativnim zonama ventralnog dijela lateralnog telencefaličkog zida kao i u proliferativnim zonama medijalnog telencefaličkog zida ne može se uočiti intenzivna GAD65 reaktivnost kao u području ganglijskog brežuljka. Također, na ovoj razini nema niti toliko intenzivne reaktivnosti u bazalnom telencefalonu. Na presjeku u razini stražnjeg dijela talamusa (C), na mjestu prijelaza dorzalnog u ventralni hipokampus koji na ovom preparatu nije vidljiv, GAD65 reaktivnost vidljiva je u ganglijskom brežuljku i hipotalamsu od kojega vlakna iz lateralne polovice odlaze prema dorzalno.

**Slika 5.39** Majmun E48, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD65 (A, B) i kalbindin (C, D).

U ventralnom dijelu lateralne stijenke telencefalona (bliže ganglijskom brežuljku) vidljiva su tri migratorna puta (engl. *stream*) GAD65 reaktivnih stanica (isprekidane strelice, A). Najizraženiji je put koji ide kroz cijelu debljine subventrikularne zone, dok su u marginalnoj zoni migratorne stanice poredane u 2 do 3 reda. Treći put je ispod kortikalne ploče gdje su stanice najrjeđe postavljene. U intermedijalnoj zoni i kortikalnoj ploči GAD65 reaktivne migratorne stanice mogu se zapaziti samo sporadično, dok ih u ventrikularnoj zoni nema. Gustoća stanica progresivno se smanjuje prema dorzalno (B), što je najizraženije u subventrikularnoj zoni (isprekidane strelice, B). Iako je i u marginalnoj zoni i sloju ispod kortikalne ploče gustoća migratornih stanica manja, ipak su one ovdje još relativno brojne, ali ne dosežu do krajnjih dijelova palijuma pa tako u području hipokampusa uopće nema GAD65 pozitivnih stanica. Ovo ukazuje kako migracija GABA-ergičkih neurona kroz marginalnu zonu i sloj ispod kortikalne ploče započinje ranije nego migracija u subventrikularnoj zoni. Međutim, u području (C) gdje se hipokampus nastavlja u stijenku dorzalnog telencefalona (Cx) subpijalno se nalaze kalbindin reaktivne stanice koje dolaze iz manjih ograničenih dijelova ventrikularne zone hipokampusa i spojnog mjesta prema koroidnom spletu. Također, pojedine stanice primordijalne hipokampalne ploče pokazuju intenzivnu kalbindinsku reaktivnost. U području septuma (D) također se vide manja ograničena kalbindin reaktivna mjesta unutar proliferativne zone, a stanice se u ograničenom snopu usmjeravaju prema marginalnoj zoni gdje mijenjaju smjer i rasipaju se dalje tangencijalno po marginalnoj zoni.





**Slika 5.39** Majmun E48, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD65 (A, B) i majmun E46, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalbindin (C, D).



Ovi rezultati pokazuju da stanice koje sintetiziraju GABA-u još nisu došle u područje hipokampusa, s obzirom da ni stanice koje sintetiziraju GAD67 nisu došle u ovo područje. Kalbindin pozitivne stanice koje potječu iz hipokampalnih i spojnih zona prema koroidnom spletu mogu biti ne-GABA-ergičke stanice, ali se ne može isključiti kako se radi i o stanicama koje će kasnije eksprimirati GAD.

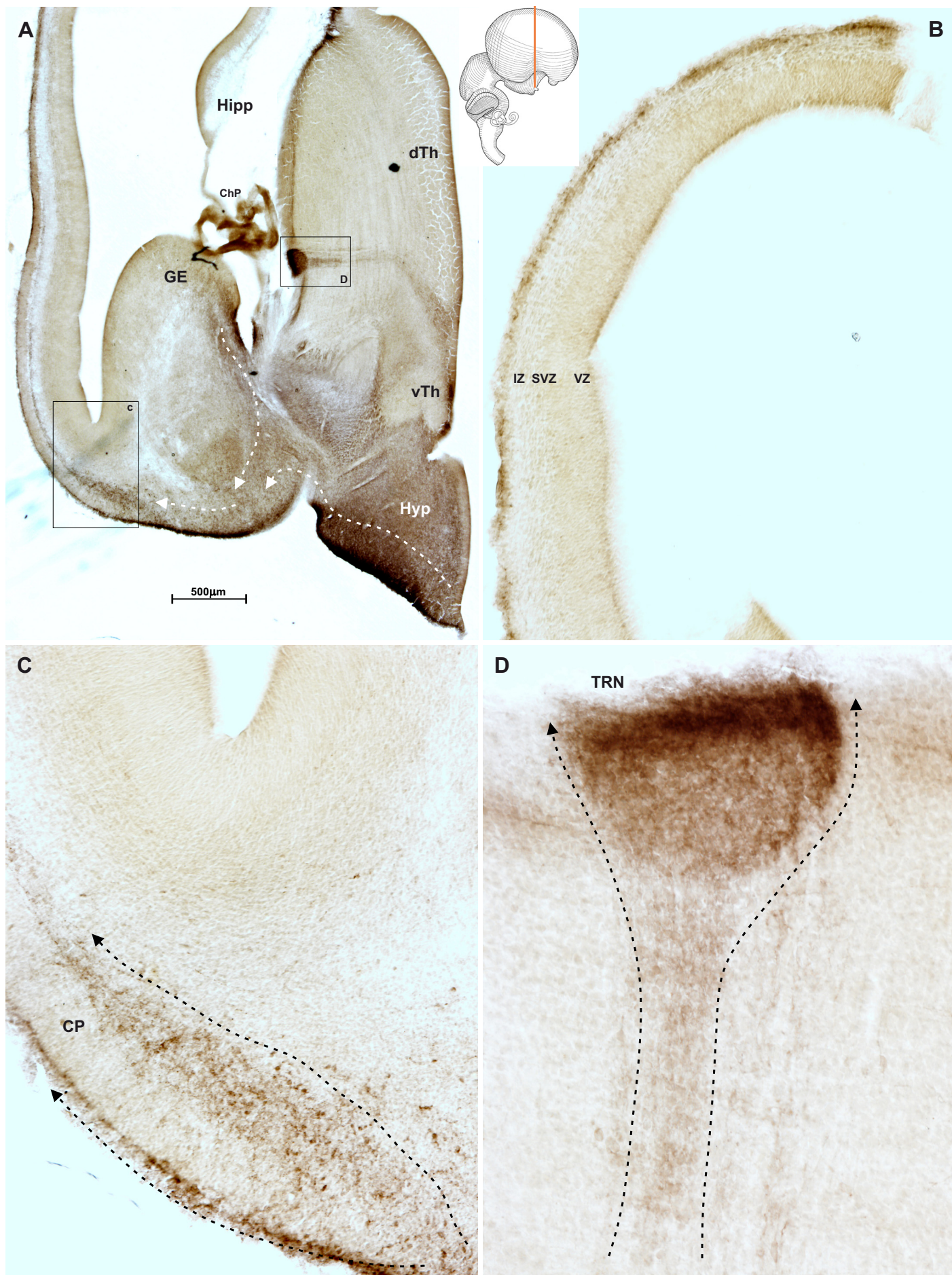
**Slika 5.40** Majmun E48, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD67. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli C i D.

Panel A prikazuje presjek u razini hipotalamusa i prelaska prednjeg u srednji dio talamusa (susjedan rezovima sa slike 5.38A i 5.38B), dok panel B prikazuje dorzalni i dorzomedijalni dio lateralne telencefaličke stijenke istog reza. Reaktivnost u diencefalonu vrlo je slična GAD65 reaktivnosti na slici 5.38A uz dojam kako je GAD67 reaktivnost intenzivnija. Međutim, u bazalnom dijelu telencefalona GAD67 reaktivnost prisutna je ventromedijalno od ganglijskog brežuljka i nastavlja se u intenzivnu reaktivnost stanica na bazi telencefalona koja se zatim proteže prema lateralno, dijelom u sloj ispod kortikalne ploče, a dijelom u marginalnu zonu. U sloju ispod kortikalne ploče vidljiv je ventro-dorzalni gradijent u gustoći stanica te se njih u srednjem dijelu lateralnog telencefaličkog zida više ne može uočiti, za razliku od brojnih GAD67 reaktivnih stanica u marginalnoj zoni (B). Također vidljiva je i kontinuirana intenzivna reaktivnosti na bazalnoj površini korteksa od hipotalamusa prema bazalnom telencefalonu i dalje u marginalnu zonu lateralnog telencefaličkog zida.

U području lateralnog dijela bazalnog telencefalona GAD67 reaktivne stanice nakupljaju se ispod kortikalne ploče i dalje nastavljaju u sloj ispod kortikalne ploče, dok dio stanica koje medio-bazalno kroz telencefalon i bazalno kroz hipotalamus tvore intenzivno reaktivan sloj ispod pije, nastavlja u sloj kroz marginalnu zonu (isprekidane strelice, C). Oko GAD67 pozitivnih stanica ispod kortikalne ploče vidljiv je splet tankih nastavaka s proširenjima, koji odgovaraju aksonima. Ispod sredine lateralne površine talamusa gusto se nakupljaju stanice buduće retikularne jezgre (D). Ove stanice radijalno migriraju od ventralnih dijelova proliferativne zone talamusa u radijalno orijentiranim stupićima blago GAD67 reaktivnih stanica. U nekim dijelovima se mogu vidjeti nastavci koji najvjerojatnije odgovaraju migratornom nastavku. Od nakupine GAD67 pozitivnih stanica u sredini lateralne površine talamusa, prema ventralno i dorzalno, vide se slabo reaktivne stanice. To ukazuje da se, nakon što radijalno migriraju, ove stanice tangencijalno šire uz lateralnu površinu.

**Slika 5.41** Majmun E48, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD67. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli B-D.

Panel A prikazuje presjek u razini stražnjeg dijela talamusa, na mjestu prijelaza dorzalnog u ventralni hipokampus (rez susjedan rezu 5.38C). U ventromedijalnom dijelu



**Slika 5.40** Majmun E48, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD67. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli C i D.

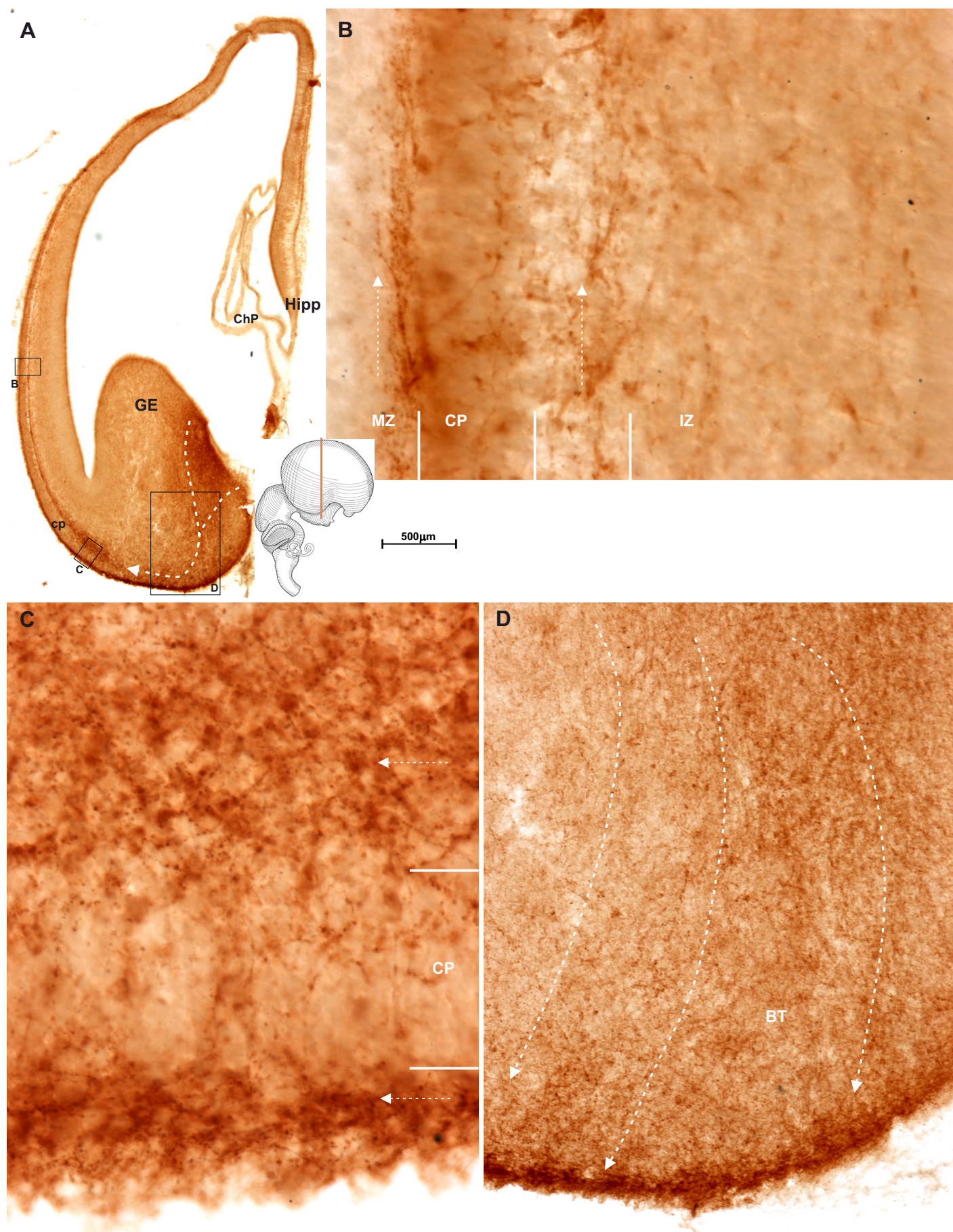


lateralnog telencefaličkog zida, od ganglijskog brežuljka prema mediobazalnoj površini, vidljiva je GAD67 reaktivnost (isprekidane strelice). U ovom području nema jače GAD65 reaktivnosti koja je pak vidljiva dorzolateralno u području proliferativnih zona ganglijskog brežuljka (slika 5.38C). U području prema sredini lateralne stijenke telencefalona u marginalnoj zoni vidljive su GAD67 pozitivne horizontalno orijentirane stanice, kao i u sloju ispod kortikalne ploče. Od ventralno prema dorzalno gustoća i broj GAD67 pozitivnih stanica ispod kortikalne ploče progresivno se smanjuje te je u ovom dijelu manje stanica ispod kortikalne ploče nego u marginalnoj zoni (B). U području lateralnog dijela bazalnog telencefalona (C) vidljiv je relativno debeo sloj brojnih intenzivno GAD67 reaktivnih stanica u marginalnoj zoni i ispod kortikalne ploče oko kojih se nalazi splet tankih vlakana s proširenjima (aksona). I kroz kortikalnu ploču vidljive su GAD67 reaktivne stanice koje daju dojam stanica koje prolaze ovim slojem, a vide se i aksoni koji povezuju ove dvije zone. U području medijalnog dijela bazalnog telencefalona na samoj bazalnoj površini mozga vidljiv je izrazito gusti sloj visoko reaktivnih GAD67 stanica, koji dolazi iz dijela proliferativne zone koja se proteže od medijalnog ganglijskog brežuljaka do spoja sa koroidnim splotom (isprekidane strelice, D).

**Slika 5.42** Majmun E48, rezovi obrađeni imunohistokemijski na somatostatin.

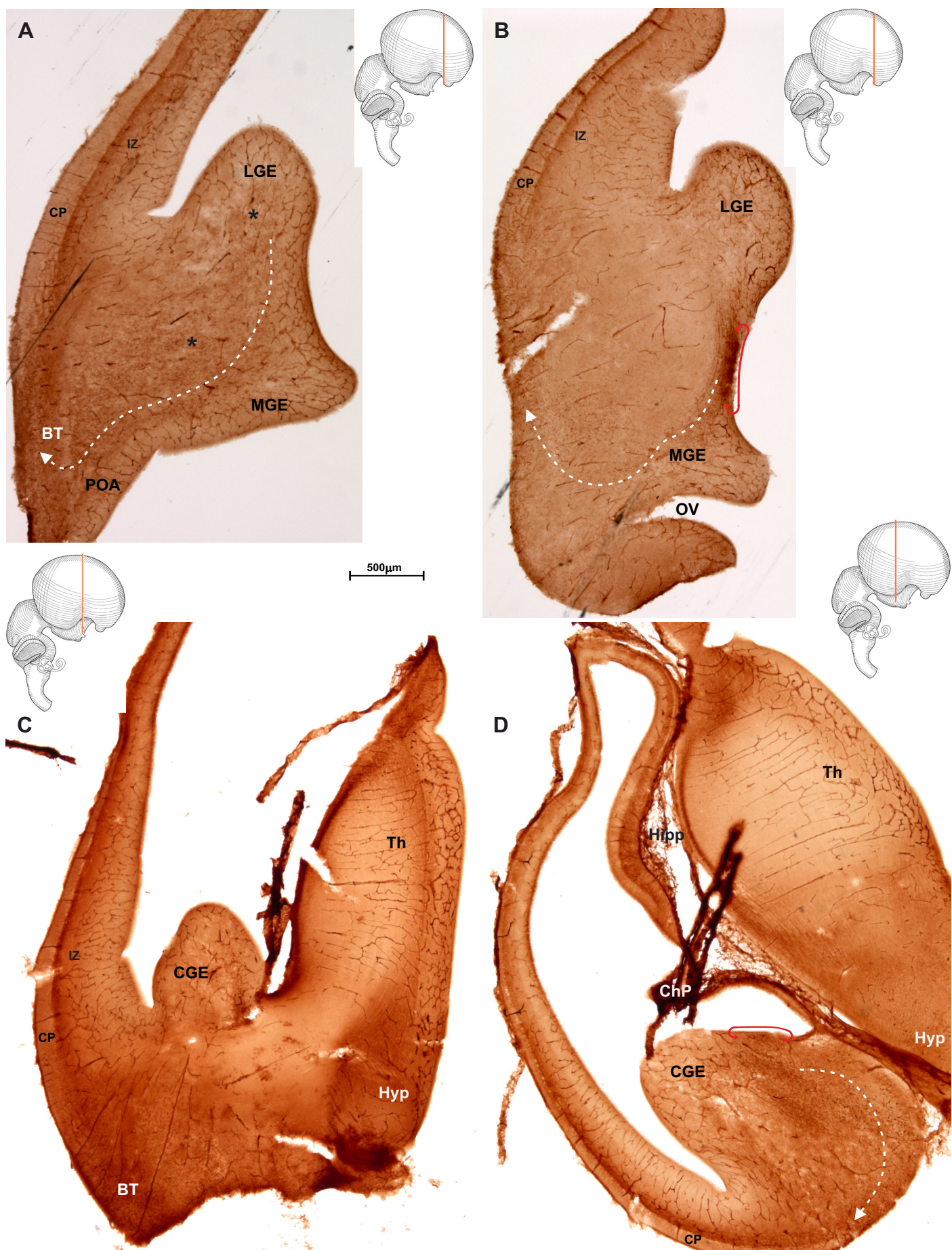
Paneli A i B su susjedni rezovi u razini septuma i paleokortikalnog ventrikula, panel A prikazuje kaudalniji rez. Srednje intenzivno somatostatin reaktivne stanice gusto su poredane u zoni koja se nalazi iznad proliferativnih zona ganglijskog brežuljka (zvjezdice, A) te su usmjerene ventralno prema bazalnom telencefalonu gdje su izrazito gusto poredane i jače reaktivne (isprekidane strelice). Ovdje se mogu vidjeti i diferencirane intenzivno reaktivne stanice (uvećano na slici 5.43C). U proliferativnim zonama samog ganglijskog brežuljka i lateralnog telencefalona nema stanica reaktivnih na somatostatin. U bazalnom dijelu telencefalona uz gusto poredane na somatostatin reaktivne stanice vidljiva je i intenzivna reaktivnost neuropila, koja najvjerojatnije odgovara reaktivnim vlaknima. U bazalnom dijelu telencefalona ova reaktivnost (koja se isprepliće i sa somatostatin reaktivnim stanicama) prisutna je od same pije do 300-350µm dubine, dok je u lateralnom telencefalonu ona prisutna kroz intermedijalnu zonu, a posebno je intenzivna neposredno ispod kortikalne ploče. Ovdje je reaktivnost vlakana intenzivnija od reaktivnosti u bazalnom telencefalonu dok se u palijumu progresivno stanjuje prema dorzalno.

Na presjeku u razini hipotalamusa i prednjeg dijela talamusa (C) vidljiva je somatostatinska reaktivnost koja se iz bazalnog dijela telencefalona nastavlja u intermedijalnu zonu lateralnog zida, dok je neposredno ispod kortikalne ploče reaktivnost posebno intenzivna te se progresivno stanjuje prema dorzalno. U talamusu, tanak snop intenzivno reaktivnih vlakana vidljiv je u samom dorzo-lateralnom dijelu blizu, ali ne uz samu



**Slika 5.41** Majmun E48, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD67. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli B-D.





**Slika 5.42** Majmun E48, rezovi obrađeni imunohistokemijski na somatostatin.

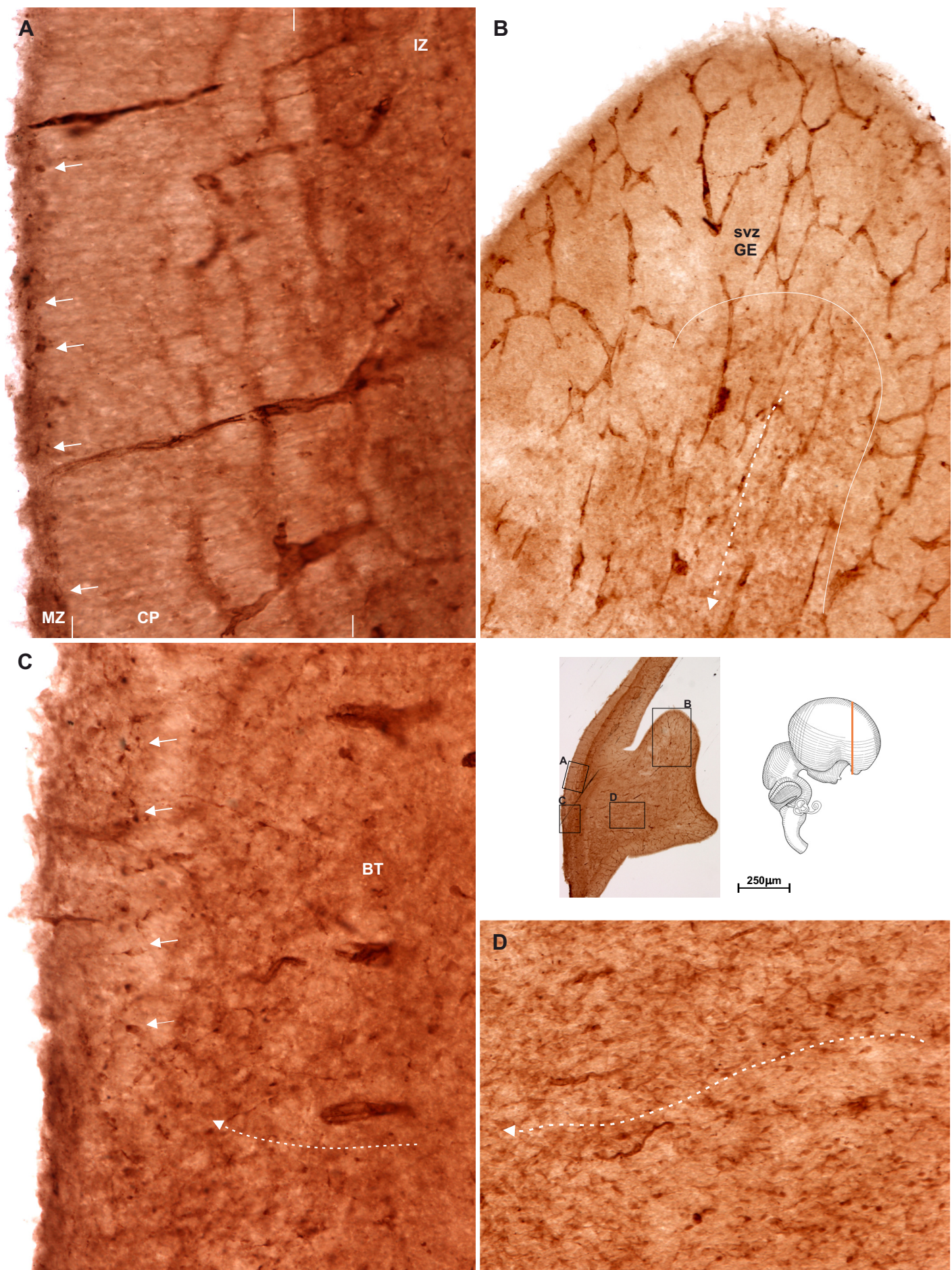


površinu. Ova reaktivnost se širi u dorzalnom vrhu talamusa i prema epitalamusu. Žilni crtež u talamusu se mijenja pa je u sloju uz ventrikularnu površinu žilna struktura više mrežolikog oblika, nakon čega postaje usmjerena okomito prema lateralnoj površini. U odnosu na prethodnu razinu, na presjeku u razini stražnjeg dijela talamusa (na mjestu prijelaza dorzalnog u ventralni hipokampus, panel D) difuzna reaktivnost prisutna je i na granici hipotalamusa i talamusa. U medijalnom dijelu hipotalamusa vidljiva je reaktivnost u snopovima koja se zatim kondenzira i proteže prema dorzalno kroz talamus u epitalamus.

Intenzivno reaktivne somatostatinske stanice mogu se zapaziti u proliferativnoj zoni koja se od ganglijskog brežuljka proteže prema ventralnom dijelu telencefalona i početku medijalnog telencefaličkog zida. Usmjerene su ventromedijalno (isprekidana strelica, D). Zanimljivo je da se i na najrostralnijem rezu (B) u proliferativnoj zoni na spoju lateralnog i medijalnog ganglijskog brežuljka (slika 5.15B) nalaze gusto poredane intenzivno reaktivne somatostatinske stanice. To ukazuje da zona porijekla somatostatinskih neurona nije sam ganglijski brežuljak, već proliferativna zona koja se u rostralnom i kaudalnom dijelu nastavlja nalazi između ganglijskog brežuljka i spoja s koroidnim spletom (crvena dvostruka strelica, B).

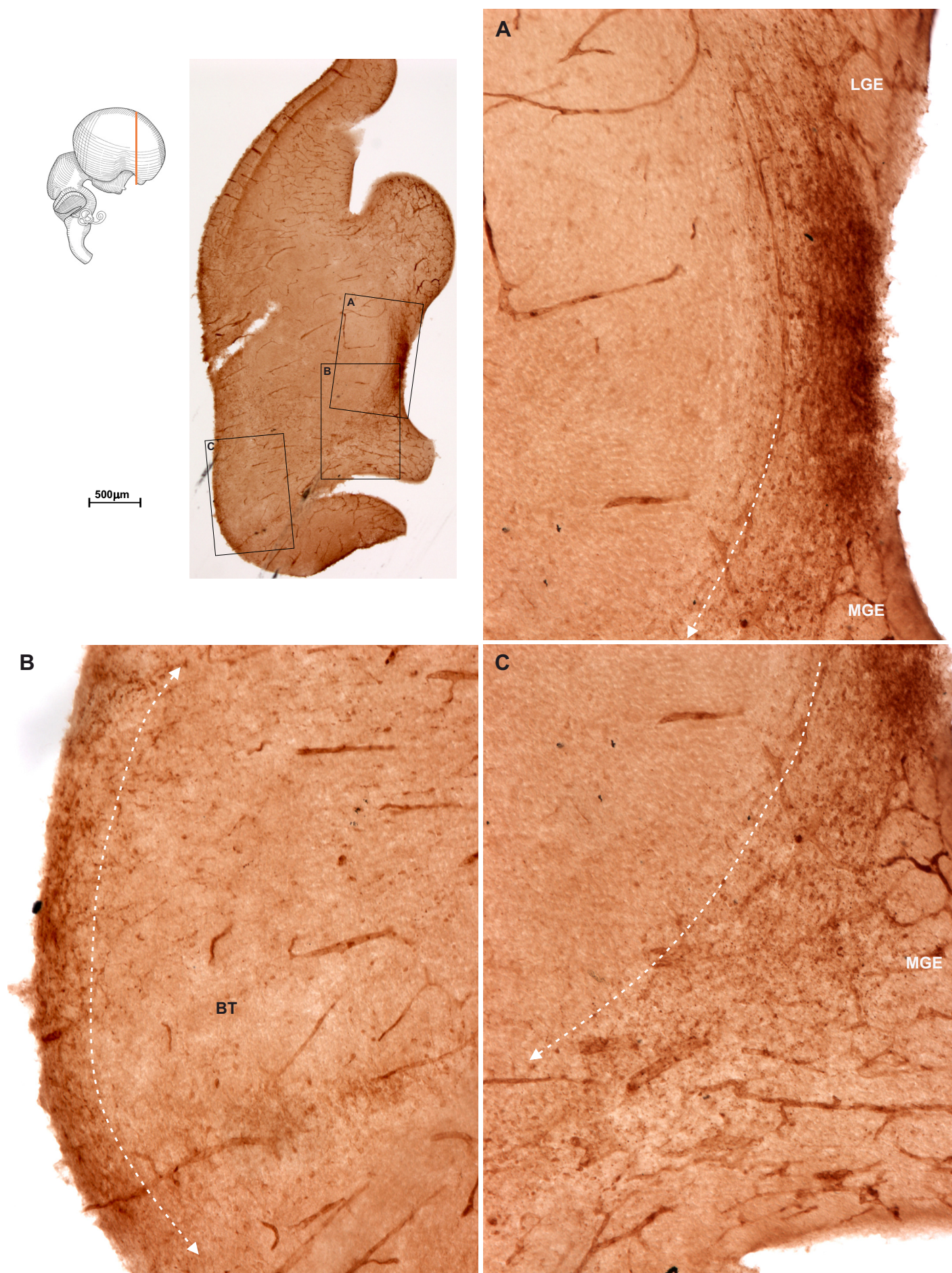
**Slika 5.43** Majmun E48, rezovi obrađeni imunohistokemijski na somatostatin. Paneli A-D prikazuju uvećane dijelove presjeka prikazanog na slici 5.42A, a točne pozicije prikaza označene su pravokutnicima na umanjenom presjeku reza.

U području ventro-lateralnog dijela palijuma, na mjestu gdje je kortikalna ploča najdeblja, intenzivno reaktivne somatostatinske stanice nalaze se u marginalnoj zoni te pokazuju početne stupnjeve diferencijacije što ukazuje da u marginalnoj zoni lateralnog telencefaličkog zida postoji ventro-dorzalni gradijent u pojavi somatostatin reaktivnih stanica (strelice, A). Ventralnije (C), na granici kortikalne ploče i marginalne zone vide se pravilno poredane stanice koje pokazuju intenzivnu tipičnu somatostatinsku reaktivnost (izrazito jako nakupljanje somatostatina u jednom dijelu citoplazme i početnom dijelu najizraženijeg nastavka). Ove stanice imaju radijalnu (piramidalnu, kruškoliku) orijentaciju i moguće je da se radi o prvim dobro diferenciranim neuronima koji se nalaze u površnom dijelu kortikalne ploče budućeg entorinalnog korteksa (strelice). Slabo reaktivne somatostatinske stanice nalaze se izvan proliferativnih zona ganglijskog brežuljka (B) odakle migriraju prema bazalnom telencefalonu (isprekidana strelica). Na putu od ganglijskog brežuljka (B) prema bazalnom telencefalonu (D) pojačava se reaktivnost u migratornim somatostatinskim stanicama (isprekidane strelice C, D).



**Slika 5.43** Majmun E48, rezovi obrađeni imunohistokemijski na somatostatin. Paneli A-D prikazuju uvećane dijelove presjeka prikazanog na slici 5.42A, a točne pozicije prikaza označene su pravokutnicima na umanjenom presjeku reza.





**Slika 5.44** Majmun E48, rezovi obrađeni imunohistokemijski na somatostatin. Paneli A-C prikazuju uvećane dijelove presjeka prikazanog na slici 5.42B, a točne pozicije prikaza označene su pravokutnicima na umanjenom presjeku reza.



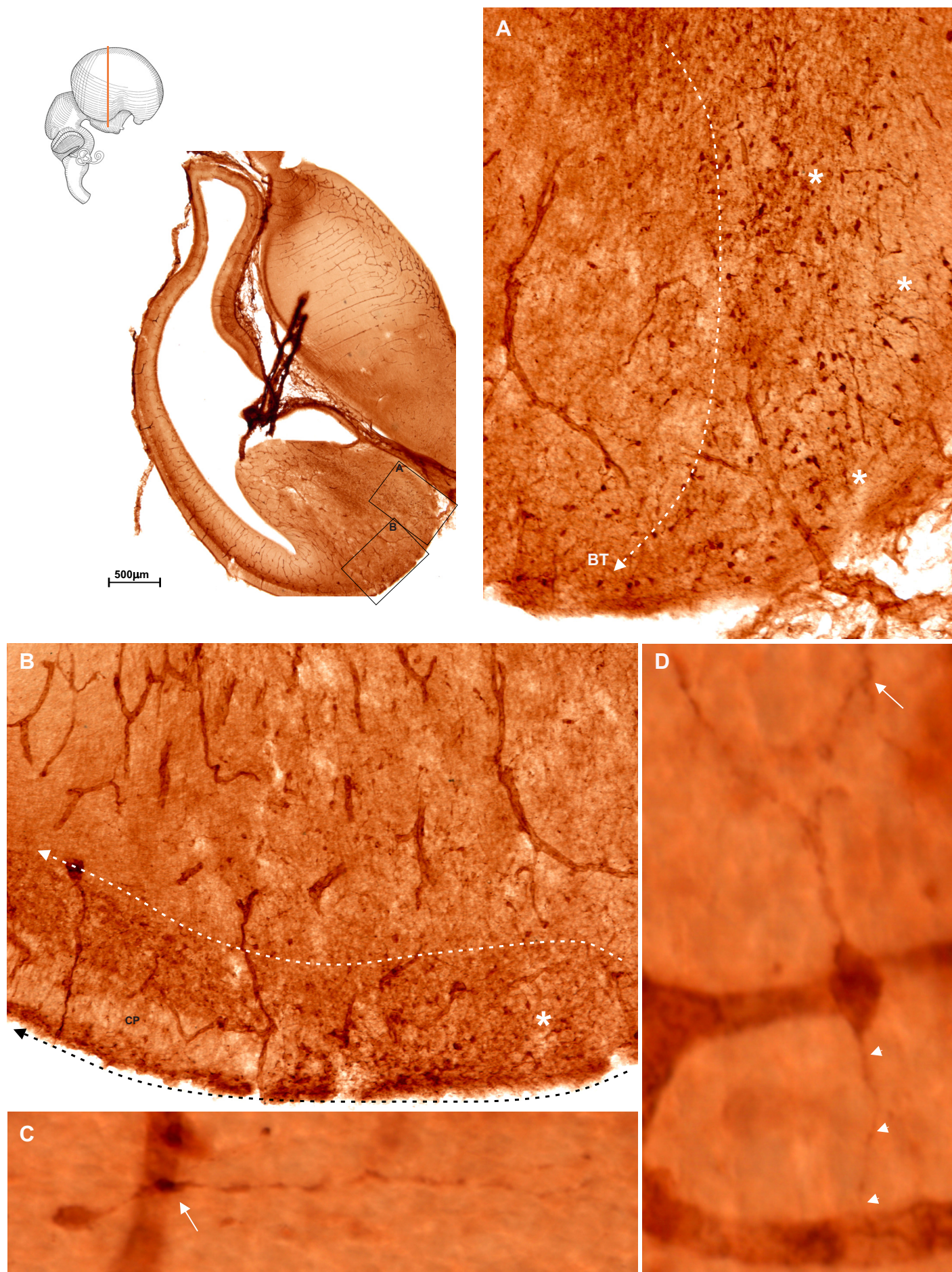
**Slika 5.44** Majmun E48, rezovi obrađeni imunohistokemijski na somatostatin. Paneli A-C prikazuju uvećane dijelove presjeka prikazanog na slici 5.42B, a točne pozicije prikaza označene su pravokutnicima na umanjenom presjeku reza.

U području spoju lateralnog i medijalnog ganglijskog brežuljka vidljivo je grupiranje intenzivno reaktivnih somatostatinskih stanica unutar proliferativne zone (A). Iz medijalnog ganglijskog brežuljka somatostatinske stanice migriraju prema bazalnom telencefalonu. U zoni proliferacije na rezu obrađenom Nissl metodom nema jasno izražene subventrikularne zone (slika 5.15B). U području bazalnog telencefalona gusto poredane intenzivno reaktivne somatostatinske stanice oko kojih se nalaze somatostatinski aksoni s brojnim proširenjima vidljive su u površnom sloju (isprekidana dvostruka strelica, B). Na putu migracije (engl. *stream*) prema bazalnom telencefalonu vidljiva je mreža proširenja koje mogu odgovarati aksonima (C).

**Slika 5.45** Majmun E48, rezovi obrađeni imunohistokemijski na somatostatin. Paneli A-D prikazuju uvećane dijelove presjeka prikazanog na slici 5.42D, a točne pozicije prikaza označene su pravokutnicima na umanjenom presjeku reza.

Na panelu A vidljivo je da iz proliferativne zone između ganglijskog brežuljka i spoja sa koroidnim spletom prema bazalnom telencefalonu migriraju brojne stanice koje su u ovom dijelu slabo do srednje reaktivne (isprekidana strelica). U ventro-medijalnom dijelu nalaze se intenzivno reaktivni, dobro diferencirani somatostatinski neuroni intenzivno reaktivnih nastavaka (zvjezdica). U mediobazalnom dijelu telencefalona gdje nema kortikalne ploče (zvjezdica, B) vide se intenzivno reaktivne somatostatinske stanice koje se u nizu protežu prema marginalnoj zoni lateralnih dijelova (isprekidana crna strelica, B). Oko ovih intenzivno reaktivnih stanica vidljive su brojne slabije reaktivne stanice koji se akumuliraju na medijalnom dijelu, i oko kojih je vidljiva reaktivnost neuropila. Ova reaktivnost neuropila s vidljivim slabije reaktivnim stanicama nastavlja se u reaktivnost koja je vidljiva ispod kortikalne ploče (isprekidana bijela strelica, B).

Na panelu C prikazan je unipolarni, najvjerojatnije migratorni neuron u intermedijalnoj zoni lateralnog telencefalona. Na mjestu gdje dolazi u dodir s krvnom žilom, vidljivo je intenzivno reaktivno proširenje (strelica). Na panelu D prikazan je bipolarni diferencirani neuron koji se nalazi u sloju ispod kortikalne ploče. S jednog kraja izlazi deblji nastavak koji odgovara dendritu te daje i dendrite trećeg reda grananja (strelica), dok s drugog kraja izlazi tanak nastavak koji odgovara aksonu.



**Slika 5.45** Majmun E48, rezovi obrađeni imunohistokemijski na somatostatin. Paneli A-D prikazuju uvećane dijelove presjeka prikazanog na slici 5.42D, a točne pozicije prikaza označene su pravokutnicima na umanjenom presjeku reza.

## **Računalno-mikroskopska rekonstrukcija Mash1, GAD65, GAD67, somatostatinskih i kalretininski rezova**

**Slika 5.46** Majmun E48, računalna rekonstrukcija rezova obrađenih imunohistokemijski na GAD67 (A) i GAD65 (B-D).

Paneli prikazuju presjeke kroz rostralni dio telencefalona. U rostralnim dijelovima mali broj stanica pokazuje GAD67 reaktivnost (A), za razliku od GAD65 reaktivnih stanica koje su široko rasprostranjene. U proliferativnim zonama ventralnog telencefalona gotovo sve stanice su intenzivno reaktivne na GAD65, kao i stanice na površini bazalnog telencefalona (područja označena plavo na panelima B i D). Dok su stanice u proliferativnim zonama okrugle, u području bazalnog telencefalona vidljiv je veći broj unipolarnih stanica (zeleno). Distribucija unipolarnih GAD65 stanica ukazuje na dva glavna migratorna puta (C), jedan kroz bazalni telencefalon, a drugi iz lateralnog ganglijskog brežuljka u dorzalni palijum. Za razliku od toga, migratorne GAD67 stanice pristune su samo u području septuma te s tog mjesta odlaze prema piji ili u dorzalni dio medijalnog zida (A).

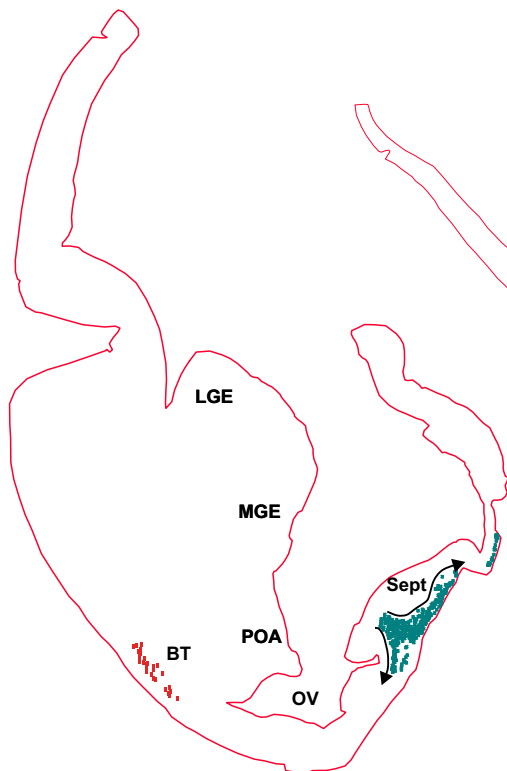
**Slika 5.47** Majmun E48, računalna rekonstrukcija rezova obrađenih imunohistokemijski na GAD65 (plavo) i GAD67 (rozo). Zone reaktivnosti dobivene su preklapanjem dva susjedna reza.

Paneli prikazuju serijske koronalne presjeke od rostralne (A) prema kaudalnim razinama (D). Unutar proliferativnih zona telencefalona rijetke stanice imaju visok stupanj ekspresije oba enzima te su zone proliferacije u kojima dominira jaka ekspresija jednog od enzima jasno odvojene. Intenzivna GAD67 reaktivnost nalazi se i u spojnoj zoni između medijalnog i lateralnog ganglijskog brežuljka (slika 5.36A), kao i gusta GAD67 reaktivnost u bazalnim dijelovima telencefalona koja je u kontinuitetu s gustom GAD67 reaktivnošću u hipotalamusu i ventralnom dijelu talamusa (slika 5.40), što zbog jasnoće nije prikazano na ovim rekonstrukcijama.

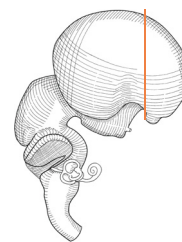
Za razliku od GAD65 reaktivnosti koja se izvan proliferativnih zona nalazi u migratornim stanicama koje su relativno gusto poredane, ali ipak jasno razdvojene nereaktivnim stanicama i aksonima, GAD67 reaktivnost je u medio-bazalnom telencefalonu prisutna u gotovo svim stanicama i okolnim aksonima (slika 5.36 i 5.37). U središnjim i kaudalnim dijelovima telencefalona GAD67 reaktivnost nije jasno izražena u samom ganglijskom brežuljku, već u proliferativnoj zoni koja se od medijalnog dijela ganglijskog brežuljka proteže prema ventralno i nastavlja u medijalni telencefalički zid. U središnjim dijelovima telencefalona (A, B) samo mali dio najmedijalnijeg dijela ganglijskog brežuljka i proliferativna zona medijalnog zida ima gusto poredane intenzivno GAD67 reaktivne stanice. U kaudalnim dijelovima telencefalona (C, D), GAD67 stanice su gusto nakupljene i kroz cijelu



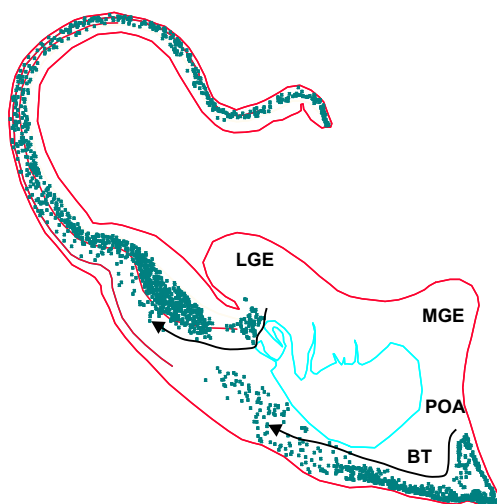
**A - GAD67**



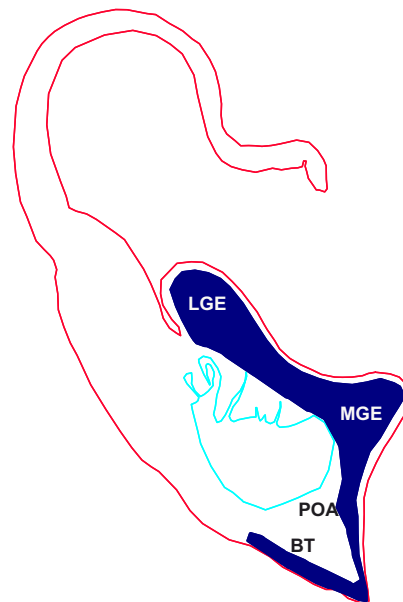
**B - GAD65**



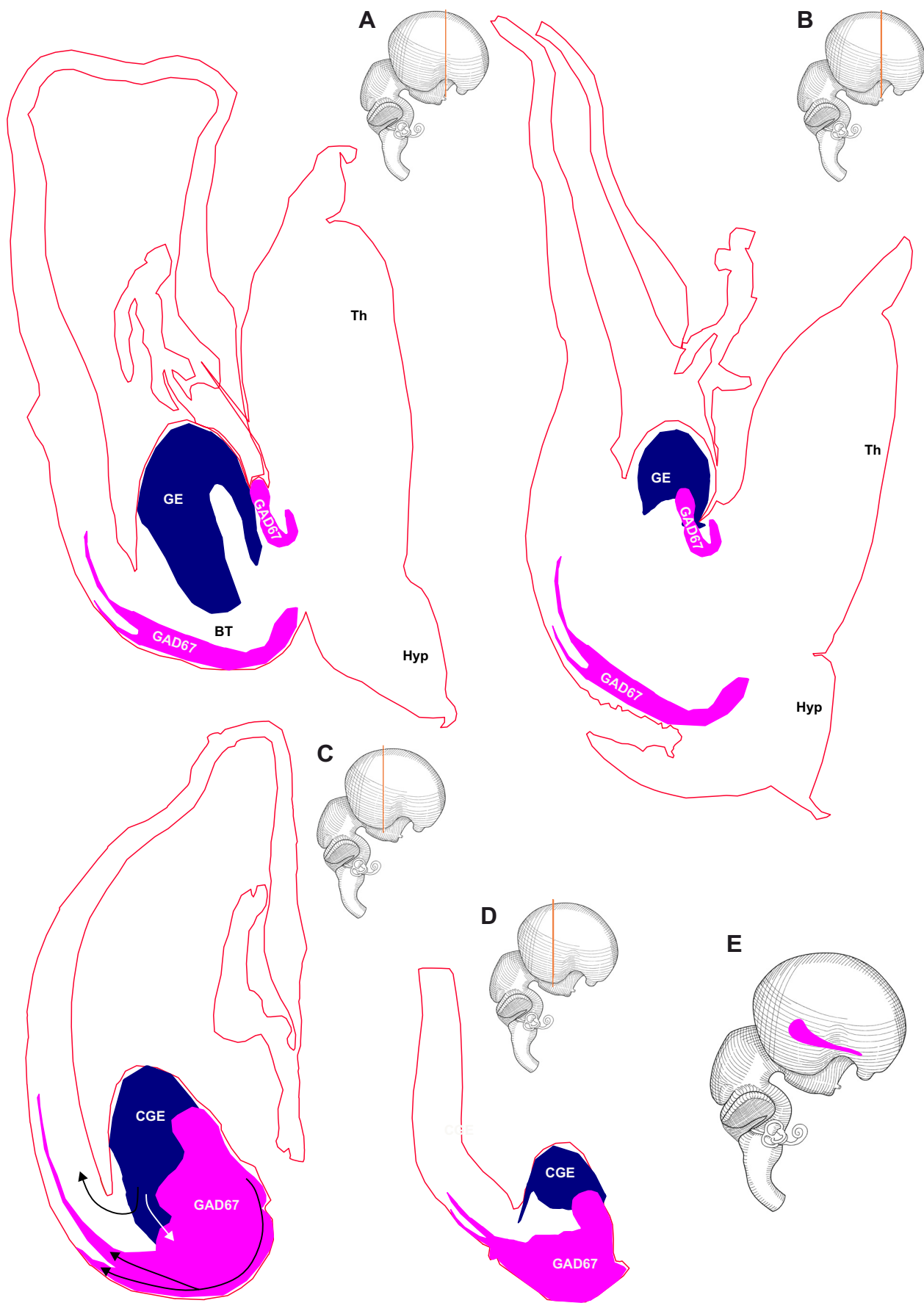
**C - GAD65**



**D - GAD65**



**Slika 5.46** Majmun E48, računalna rekonstrukcija rezova obrađenih imunohistokemijski na GAD67 (A) i GAD65 (B-D).



**Slika 5.47** Majmun E48, računalna rekonstrukcija rezova obrađenih imunohistokemijski na GAD65 (plavo) i GAD67 (rozo). Zone reaktivnosti dobivene su preklapanjem dva susjedna reza.

medio-bazalnu stijenku izvan proliferativnih zona te se protežu u lateralnu stijenku ispod i iznad kortikalne ploče. Prema rostralno (E) se može uočiti smanjenje kontinuiteta ovih gusto poredanih stanica u bazalnom i ventro-lateralnom dijelu pa se na najrostralnijim razinama bazalno nalazi samo mala nakupina stanica (slika 5.46A). To ukazuje da GAD67 reaktivne migratorne stanice dolaze iz kaudalnih dijelova ventralnih proliferativnih zona i kroz bazalni telencefalon migriraju prema rostralno.

Rostralnije, uz GAD67 reaktivnost u spojnem dijelu između medijalnog i lateralnog ganglijskog brežuljka, ista se može uočiti i u malom dijelu septuma ispred kalozalne ploče (slika 5.35 i 5.36). Doduše, na rostralnoj razini postoji i visok intenzitet GAD65 reaktivnosti u ovim područjima pa ovdje većina stanica proliferativne zone izražava obje varijante GAD-a.

**Slika 5.48** Majmun E48, računalna rekonstrukcija rezova obrađenih imunohistokemijski na GAD65 (plavo, A) i GAD67 (rozo, A) te na somatostatin (B). Zone GAD65 i GAD67 reaktivnosti dobivene su preklapanjem dva susjedna reza (A).

Na panel A, prikazan također na slici 5.47C (A), projicirana je pozicija migratornih somatostatinskih stanica (B). Vidljivo je da se migratorne somatostatinske stanice preklapaju sa zonom intenzivne GAD67 reaktivnosti.

**Slika 5.49** Majmun E48, računalna rekonstrukcija rezova obrađenih imunohistokemijski na GAD65 (A) i kalretinin (B).

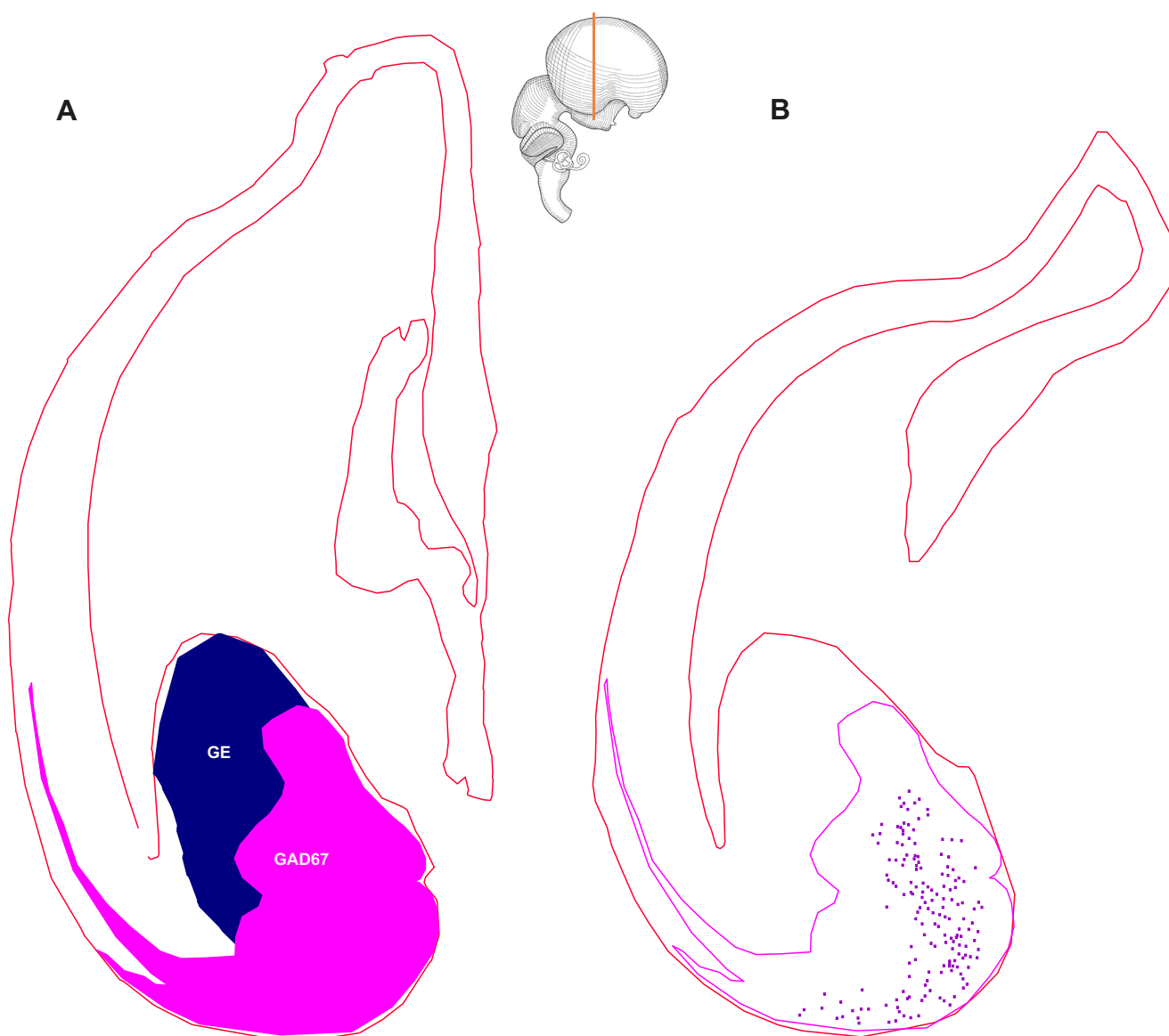
Panel A prikazuje presjek prikazan na slici 5.46D (plavo ispunjena područja prikazuju GAD65 reaktivnost). Panel B je susjedan presjek koji prikazuje gustoću kalretininskih stanica unutar lateralnog ganglijskog brežuljka (LGE), lateralnog migratornog puta (LMS) i bazalnog telencefalona (BT).

Gustoća kalretininskih stanica relativno je velika unutar lateralnog dijela ganglijskog brežuljka. Najveća je na mjestu izlaska migratornih stanica, dok je u bazalnom telencefalonu značajno manja, što je posljedica masivnije migracije stanica u lateralnu stijenku telencefalona.

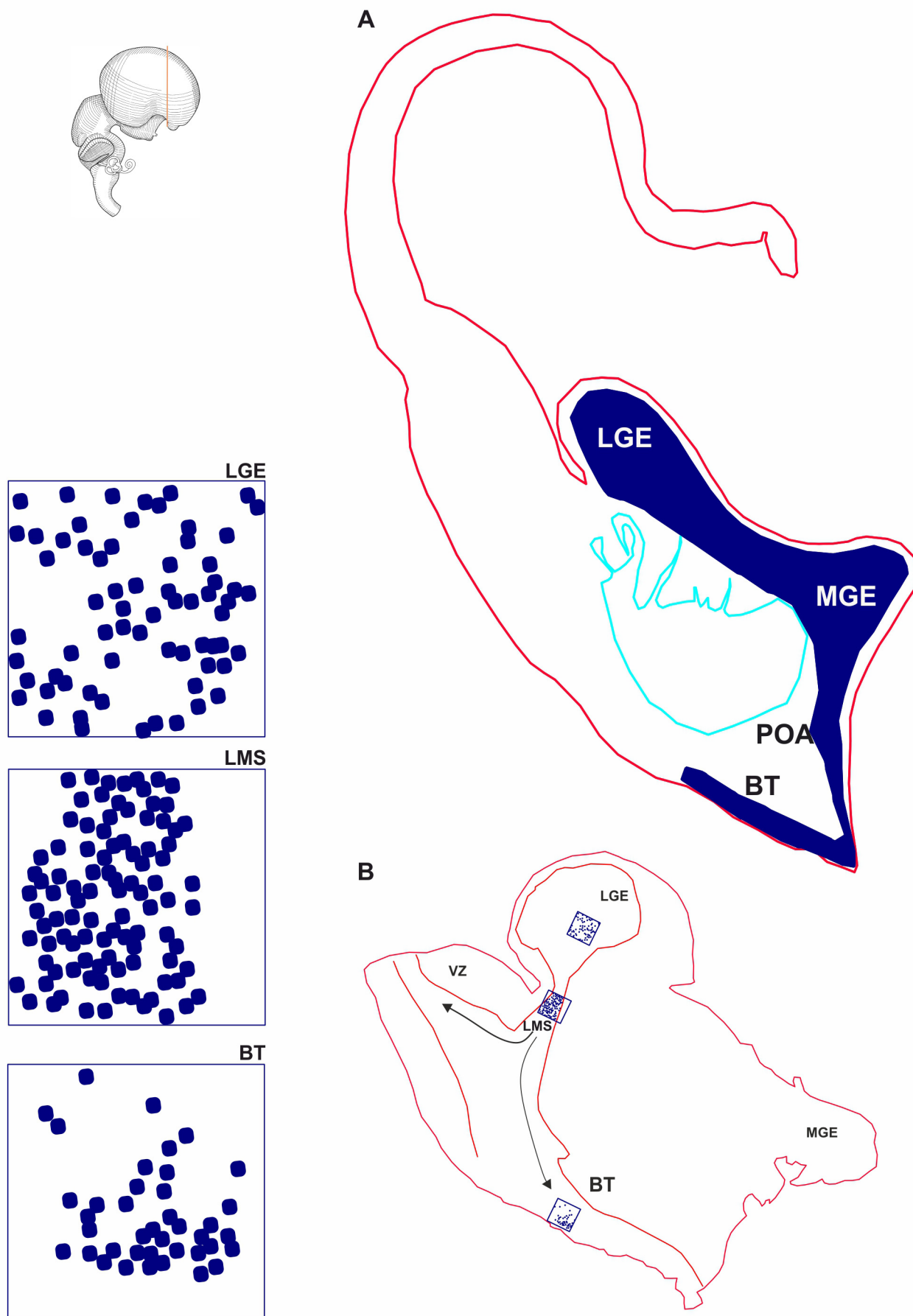
**Slika 5.50** Majmun E48, računalna rekonstrukcija rezova obrađenih imunohistokemijski na Mash1.

Paneli prikazuju serijske koronalne presjeke od rostralne (A) prema kaudalnim razinama (D). Ispunjene površine označavaju zone Mash1 reaktivnosti u proliferativnim zonama bazalnog telencefalona (plavo – ganglijski brežuljak), preoptičkog područja i hipotalamusa (žuto) te talamusa (narančasto).

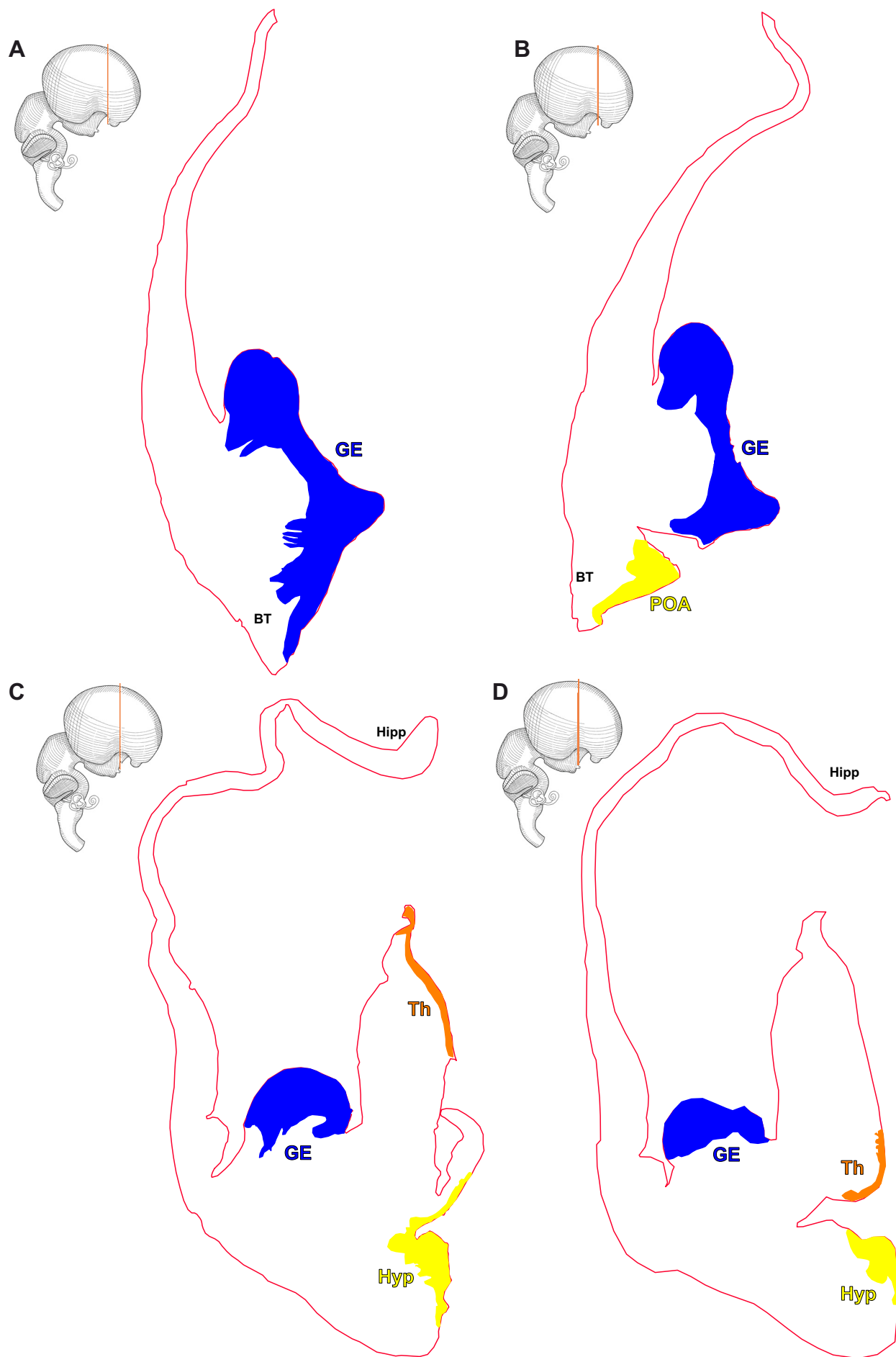




**Slika 5.48** Majmun E48, računalna rekonstrukcija rezova obrađenih imunohistokemijski na GAD65 (plavo, A) i GAD67 (rozo, A) te na somatostatin (B). Zone GAD65 i GAD67 reaktivnosti dobivene su preklapanjem dva susjedna reza.



**Slika 5.49** Majmun E48, računalna rekonstrukcija rezova obrađenih imunohistokemijski na GAD65 (A) i kalretinin (B).



**Slika 5.50** Majmun E48, računalna rekonstrukcija rezova obrađenih imunohistokemijski na Mash1.



## **5.2 STADIJ II U MAJMUNA (E50-E70) I ČOVJEKA (11-14PCW): RANO FETALNO RAZDOBLJE**

Histoanatomske promjene tijekom ranog fetalnog razdoblja posljedica su urastanja vlakana u telencefalički zid te izrazito intenzivne proliferacije neurona koji dovode do oblikovanja i ograničavanja subkortikalnih struktura, što je posebno izraženo na jezgrama amigdaloidnog kompleksa i medio-bazalnog telencefalona. Kapsula interna je u potpunosti razvijena, a osnova korpus kalozuma je jasno prisutna te se čini kako veći broj vlakana prelazi iz jedne u drugu hemisferu. Gustoća urastajućih i izrastajućih vlakana mijenja organizaciju laminacije dorzalnog telencefalona (palijuma), što je izraženije rostralno i ventralno, nego kaudalno i dorzalno. Telencefalički zid završetkom ovog razdoblja ima tipičnu ranu fetalnu laminaciju u svim dijelovima.

### **5.2.1 Tangencijalna migracija u majmuna između 52. i 56. embrionalnog dana**

U razdoblju E50-E60 analizirani su rezovi tkiva mozga dva majmuna u dobi E52 i E56 obojeni Nissl metodom te obrađeni imunohistokemijskim metodama.

#### **5.2.1.1 Laminarna organizacija telencefalona i zone stvaranja tangencijalno migrirajućih stanica**

U dobi E50-E60 analizirani su rezovi majmunskog tkiva mozga obojeni Nissl metodom te obrađeni imunohistokemijskim metodama za otkrivanje biljega progenitorskih stanica (Mash1, Ki67).

U stadiju E52, na Ki67 preparatima do izražaja dolaze proliferativne zone koje zauzimaju najmanje trećinu površine reza (slika 5.51). Proliferativne stanice gusto su poredane kroz ventrikularnu i subventrikularnu zonu. I u donjem dijelu intermedijalne zone nalaze se relativno brojne Ki67 reaktivne stanice, ali je njihova gustoća daleko manja nego u proliferativnim zonama. Sporadično se Ki67 reaktivne stanice mogu zamijetiti i u gornjem dijelu intermedijalne zone, a gusto su poredane na samoj pijalnoj površini. Na dijelu medijalnog zida gdje nema hipokampalne ploče vidi se tračak stanica koji je iz proliferativne (ventrikularne) zone usmjeren prema površini te se zatim raspršuje subpijalno (slika 5.52A). Najvjerojatnije se radi o progenitorima znatih stanica girus dentatusa koji putuju prema budućem hilusu (slika 5.53B).

U ovom stadiju relativno veliki udio u proliferativnim zonama telencefalona pripada subpalijalnim proliferativnim zonama u kojima gotovo sve stanice izražavaju Mash1, dok u većini palijalnih proliferativnih zona nema Mash1 reaktivnih stanica (slika 5.52C). Mash1

reaktivne stanice u ganglijskom brežuljku, proliferativnim zonama preoptičkog područja i septuma imaju nešto veću reaktivnost i gustoću u ventrikularnoj zoni (slika 5.53).

U proliferativnim zonama palijuma Mash1 reaktivnost (slika 5.54) prisutna je u rostralnom (slika 5.55) i ventro-kaudalnom (slika 5.56) dijelu medijalnog telencefaličkog zida gdje je većina stanica ventrikularne zone reaktivna na Mash1. Mash1 reaktivnost ne može se uočiti u stanicama izvan proliferativne zone, osim u središnjem dijelu medijalnog zida gdje se ventrikularna zona razrjeđuje i prelazi u koroidni epitel. Ovdje stanice u uskom području odlaze iz ventrikularne zone te se raspršuju prema pijalnoj površini (slika 5.55C i 5.56A). Uspoređujući gustoću Mash1 pozitivnih stanica u odnosu na gustoću Ki67 stanica (slika 5.52B) može se zaključiti da većina progenitora znatih stanica dentatusa izražava Mash1. U diencefalonu se, kao i u telencefalonu gdje je ekspresija prisutna u ventralnom dijelu (slika 5.57A), mogu uočiti Mash1 reaktivne zone koje odgovaraju ventralnim dijelovima diencefaličkih struktura (slika 5.57B).

Na Nissl obojenim rezovima je početkom ranog fetalnog razdoblja u svim dijelovima telencefaličkog zida prisutna tipična rana fetalna laminacija od pet osnovnih slojeva (slika 5.58). Najpovršnije je marginalna zona ispod koje se vidi kortikalna ploča koja je sada razvijena u svim kortikalnim dijelovima, uključujući i hipokampus (slika 5.59). U rostralnim dijelovima telencefalona vidljivo je razrjeđenje kortikalne ploče: dublji razrjeđeni dio u dorzalnim dijelovima širinom i do dva puta premašuje kondenzirani, a granica između ta dva dijela kortikalne ploče je oštra, kao i granica prema intermedijalnoj zoni. Intermedijalna zona je posebno široka u bazo-lateralnim dijelovima zbog urastanja talamokortikalnih vlakana. Urastanjem vlakana kroz strijatum uspostavljaju se topografski odnosi između kaudatusa, putamena i akumbensa kao i u razvijenog mozga. U neopalijalnim područjima subventrikularna zona je debljinom premašila ventrikularnu, ali u sredini medijalnog zida nema jasno oblikovane subventrikularne zone. Granica između subventrikularne i intermedijalne zone je neoštra jer se gustoća stanica u subventrikularnoj zoni smanjuje se od klijetke prema površini, pa se tako razaznaje unutarnji kompaktni i vanjski difuzni dio. Ovo je značajna promjena u odnosu na stadij E52 kada je razlika u gustoći subventrikularne zone bila samo blago naglašena.

Oko razine interventrikularnog otvora (slika 5.59C, 5.59D i 5.60A) subkalozalno se vidi osnova pločice, lamina affixa, koja se ispod forniksa nastavlja i povezuje s dorzalnom stijenkama talamusa. Ovdje se vidi i diskretna nakupina stanica koja bi mogla odgovarati gangliotalamičkom tijelu, ali je moguće da se radi o stanicama koje nastaju od neuroepitela medijalnog zida, a ne o onima koji migriraju iz ganglijskog brežuljka u talamus. Unutar medijalnog zida vide se stanice razbacane između snopova aksona te između neuroepitela i aksona koje su usmjerene dorzalno prema površini. Kako se subpijalno u marginalnoj zoni dorzalnog hipokampusa vidi velika nakupina unipolarnih stanica koje nisu u kontinuitetu s

hipokampalnom pločom (slika 5.60C i 5.60D), vrlo je vjerojatno da dio ovih stanica ima porijeklo u dijelu medijalnog zida ispod forniksa te se preko hipokampusa nastavlja u marginalnu zonu neopalijskog (slika 5.60B). Ona je jasno strukturirana te se sastoji od podsloja malih zrnatih stanica poredanih u 1 do 2 reda ispod pije. Unutar tog podsloja nalaze se veće horizontalno orijentirane unipolarne stanice slabijeg intenziteta Nissl bojenja koje odgovaraju morfologiji ranih Cajal-Retziusovih stanica, a koje čine većinu unutar nakupine u marginalnoj zoni hipokampusa.

U ventro-lateralnim dijelovima stijenke u sredini intermedijalne zone vidljiv je sloj gušće poredanih stanica (slika 5.58A i 5.58B) koji intermedijalnu zonu u ovom području dijeli na unutarnji (prema subventrikularnoj zoni) i vanjski dio (prema kortikalnoj ploči). Između amigdaloidnog kompleksa i putamena u dubini i kortikalnoj ploči na površini je također vidljiv širok sloj gusto popunjen stanicama (slika 5.61). Ove nakupine stanica u kontinuitetu su s proliferativnim zonama vrha temporalnog režnja te je vrlo vjerojatno da se jednim dijelom radi o stanicama koje iz temporalnog režnja migriraju prema palijumu. Zanimljivo je kako se ovaj niz proteže preko osnove klastruma.

Na medijalnom zidu telencefalona od mjesta gdje započinje spajanje ventralnog i dorzalnog hipokampusa (slika 5.62) do mjesta gdje medijalni zid postaje neopalijski (slika 5.63), prisutna je masa gusto zbijenih stanica koje su usmjerene subpialno te se difuzno rasipaju unutar marginalne zone. Na mjestu gdje se spaja hipokampalna ploča ventralnog i dorzalnog hipokampusa, u marginalnoj zoni se nalazi masa gusto zbijenih stanica slične morfologije, od kojih većina ima obilježja ranih Cajal-Retziusovih stanica. Ovakve stanice dominiraju i u marginalnoj zoni dorzalnog hipokampusa rostralnije te se može zaključiti kako velikim dijelom imaju porijeklo upravo dijelu medijalnog telencefaličkog zida gdje dolazi do spajanja dorzalnog i ventralnog hipokampusa (slika 5.60C i slika 5.60D).



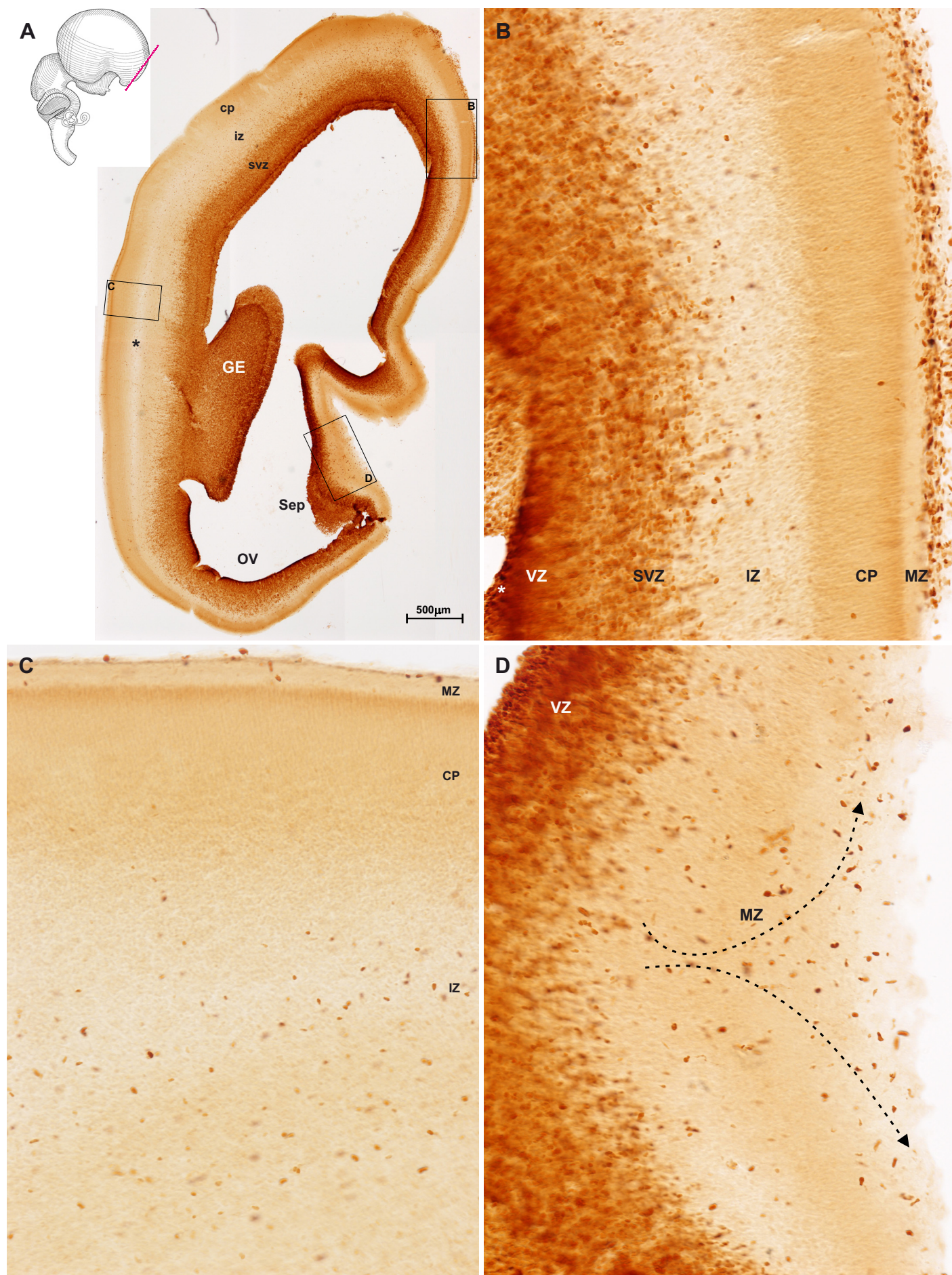
## Deskriptivna analiza Nissl, Mash1 i Ki67 rezova

**Slika 5.51** Majmun E52, rezovi obrađeni imunohistokemijski na Ki67. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli B-D.

Koronalni presjek kroz frontalni režanj na samom početku nastanka ganglijskog brežuljka i kroz najrostralniji dio dorzalnog hipokampusu (A). U lateralnim dijelovima telencefalona intermedijalna zona je najdeblja zona te u nekim dijelovima čini gotovo polovicu debljine cijele lateralne stijenke. Između kortikalne ploče i intermedijalne zone vidljiv je proziran sloj, posebno debeo u lateralnom i ventro-lateralnom dijelu (zvjezdica). Proliferativne stanice gusto su poredane kroz ventrikularnu i subventrikularnu zonu. U ventrikularnoj zoni stanice su gusto poredane, a uz klijetku i na granici prema subventrikularnoj zoni nalazi se kontinuirani podsloj sastavljen od 1 do 2 reda intenzivno Ki67 reaktivnih stanica (zvjezdica, B). U subventrikularnoj zoni gustoća reaktivnih stanica se blago smanjuje od dubljeg prema površnijem dijelu, a na granici prema subventrikularnoj zoni stanice su nakupljene u tračke tako da granica između ove dvije zone nije jasna. I u donjem dijelu intermedijalne zone nalaze se Ki67 reaktivne stanice, ali je njihova gustoća daleko manja nego u proliferativnim zonama. U gornjem dijelu intermedijalne zone mogu se tek sporadično zamijetiti Ki67 reaktivne stanice (C). Također, Ki67 reaktivne stanice gusto su poredane na samoj pijalnoj površini, no nije moguće razlučiti nalaze li se ove gusto poredane stanice i u subpijalnom dijelu marginalne zone (B). Na dijelu medijalnog zida gdje nema hipokampalne ploče vidi se tračak stanica koji je iz proliferativne (ventrikularne) zone usmjeren prema površini te se zatim raspršuje subpijalno (isprekidana strelica, D). Najvjerojatnije se radi o progenitorima zrnatih stanica girus dentatusa koji putuju prema budućem hilusu.

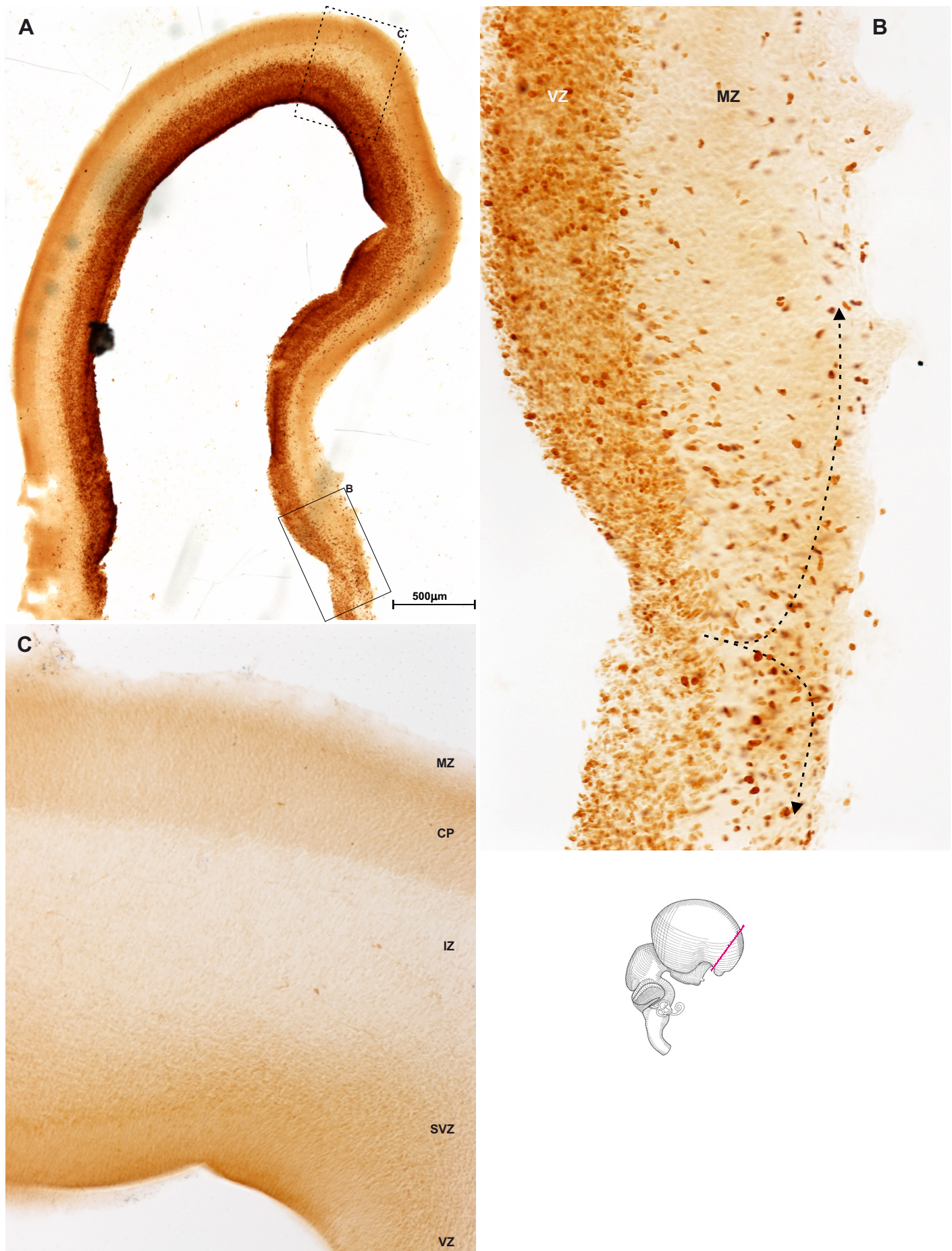
**Slika 5.52** Majmun E52, rezovi obrađeni imunohistokemijski na Ki67 (A, B) i Mash1 (C). Pravokutnik označen na panelu A uvećano je prikazan kao panel B. Panel C prikazuje područje koje odgovara području označenom isprekidanim pravokutnikom na panelu A.

Panel A prikazuje koronalni presjek koji prolazi netom iza završetka olfaktornog neuroepitela. Na ovoj razini mogu se jasno razgraničiti sve fetalne zone, što nije bio slučaj na rostralnijim presjecima. U ovom stadiju nema Mash1 pozitivnih stanica (C). Panel B prikazuje dio medijalnog zida gdje nema hipokampalne ploče i na kojem je vidljiv tračak stanica koji je iz proliferativne (ventrikularne) zone usmjeren prema površini te se zatim raspršuje subpijalno.



**Slika 5.51** Majmun E52, rezovi obrađeni imunohistokemijski na Ki67. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli B-D.





**Slika 5.52** Majmun E52, rezovi obrađeni imunohistokemijski na Ki67 (A, B) i Mash1 (C). Pravokutnik označen na panelu A uvećano je prikazan kao panel B. Panel C prikazuje područje koje odgovara području označenom isprekidanim pravokutnikom na panelu A.





**Slika 5.53** Majmun E52, rezovi obrađeni imunohistokemijski na Mash1.

**Slika 5.53** Majmun E52, rezovi obrađeni imunohistokemijski na Mash1.

Panel A prikazuje koronalni presjek kroz početni dio paleokortikalnog ventrikula. U području ganglijskog brežuljka i preoptičke proliferativne zone jasno je primjetna veća reaktivnost i gustoća Mash1 stanica u ventrikularnoj, nego u subventrikularnoj zoni. U septalnom području nema naznaka postojanja dvije proliferativne zone. Septalna i preoptička proliferativna zona nisu u kontinuitetu. Kaudalnije na presjeku kroz paleokortikalni ventrikul i sredinu oflaktorne plakode, septalna proliferativna zona se stanjuje i dodiruje s proliferativnom zonom kaudalnog dijela preoptičkog područja (B). Mash1 reaktivnost prisutna je i u području olfaktornog bulbusa. Panel C prikazuje koronalni presjek kroz stražnji dio talamusa i kroz kaudalni dio ganglijskog brežuljka. Od proliferativne zone ganglijskog brežuljka prema ventralno vidljiv je kontinuitet Mash1 reaktivnosti koja se nastavlja u medijalni telencefalički zid (zvjezdica).

**Slika 5.54** Majmun E52, rezovi obrađeni imunohistokemijski na Mash1.

Na koronalnom presjeku kroz rostralni početak komisuralne ploče (A) vidljive su intenzivno reaktivne Mash1 stanice u ventrikularnoj zoni dorzalnog dijela medijalnog telencefaličkog zida. Kaudalnije, u području hipokampalne pukotine gdje medijalni telencefalički zid ventralno prelazi u koroidni splet (B), Mash1 reaktivne stanice usmjerene su prema pijalnoj površini. Na koronalnom presjeku u kaudalnoj razini telencefalona kroz budući parijetalni i temporalni režanj (C) brojne gusto poredane Mash1 reaktivne stanice vidljive su u ventrikularnoj zoni ventralnog dijela medijalnog telencefaličkog zida. U dorzalnog dijelu vide se Mash1 pozitivne stanice koje su usmjerene prema površini.

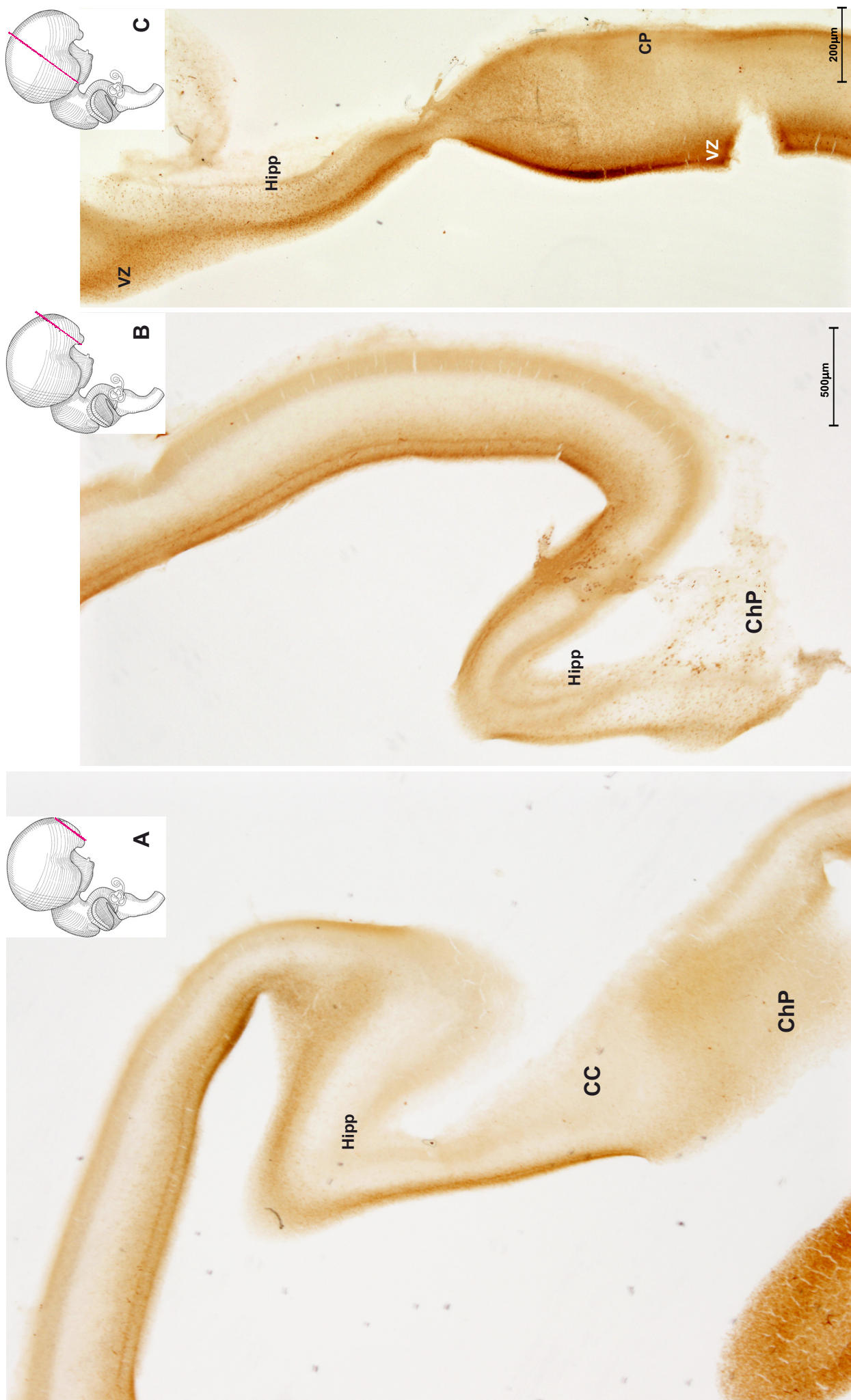
**Slika 5.55** Majmun E52, rezovi obrađeni imunohistokemijski na Mash1. Paneli A-C prikazuju uvećane dijelove presjeka prikazanog na slici 5.54A i 5.54B, a točne pozicije prikaza označene su pravokutnicima na umanjenim presjecima reza.

U ventrikularnoj zoni rostro-dorzalnog dijela medijalnog telencefaličkog zida nalaze se gusto poredane Mash1 reaktivne stanice (A), dok se prema vrhu Mash1 reaktivne stanice vide samo sporadično iznad proliferativne zone (B). U području budućeg hipokampusa i osnove dentatusa (C) Mash1 reaktivne stanice usmjerene su iz ventrikularne zone prema pijalnoj površini.

**Slika 5.56** Majmun E52, rezovi obrađeni imunohistokemijski na Mash1. Paneli A i B prikazuju uvećane dijelove presjeka prikazanog na slici 5.54C, a točne pozicije prikaza označene su pravokutnicima na umanjenom presjeku reza.

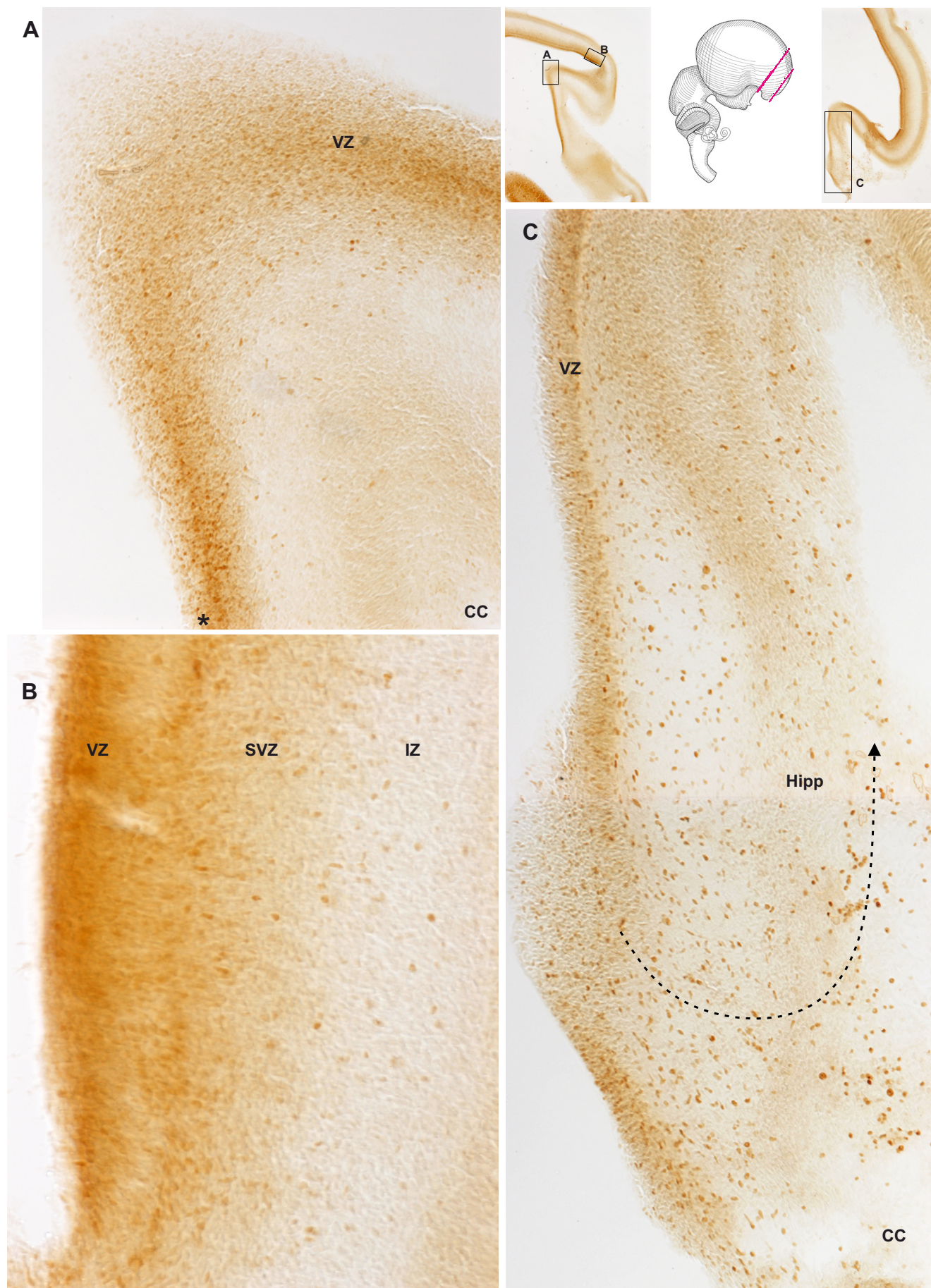
Iz ventrikularne zone dorzalnog (A) i ventralnog (B) dijela medijalnog telencefaličkog zida brojne Mash1 reaktivne stanice usmjerene su prema pijalnoj površini.





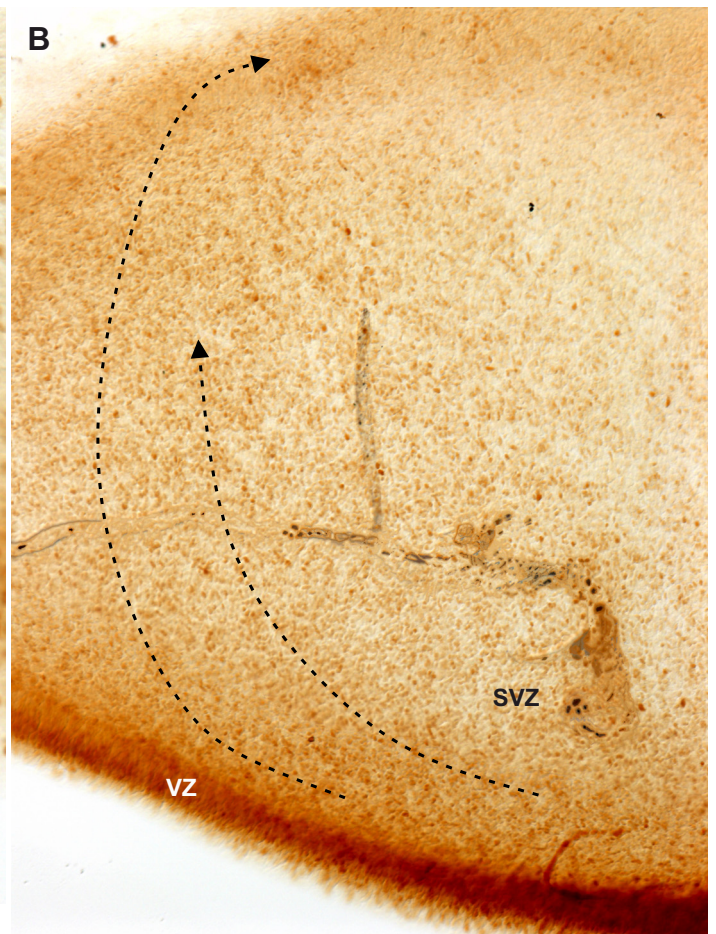
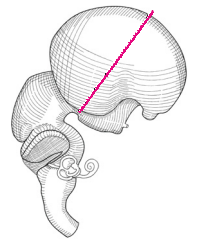
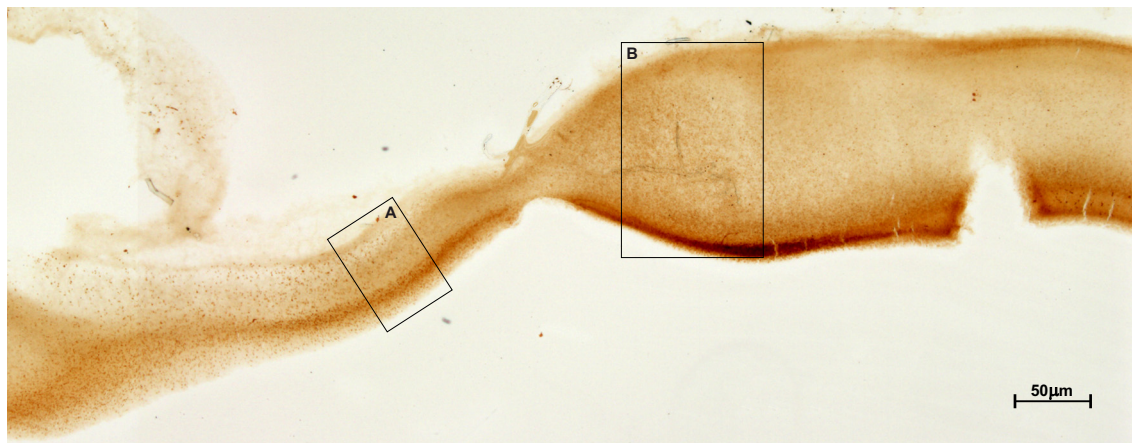
**Slika 5.54** Majmun E52, rezovi obrađeni imunohistokemijski na Mash1.





**Slika 5.55** Majmun E52, rezovi obrađeni imunohistokemijski na Mash1. Paneli A-C prikazuju uvećane dijelove presjeka prikazanog na slici 5.54A i 5.54B, a točne pozicije prikaza označene su pravokutnicima na umanjenim presjecima reza.





**Slika 5.56** Majmun E52, rezovi obrađeni imunohistokemijski na Mash1. Paneli A i B prikazuju uvećane dijelove presjeka prikazanog na slici 5.54C, a točne pozicije prikaza označene su pravokutnicima na umanjenom presjeku reza.

**Slika 5.57** Majmun E52, rez obojen Nissl metodom (A) i rez obrađen imunohistokemijski na Mash1 (B).

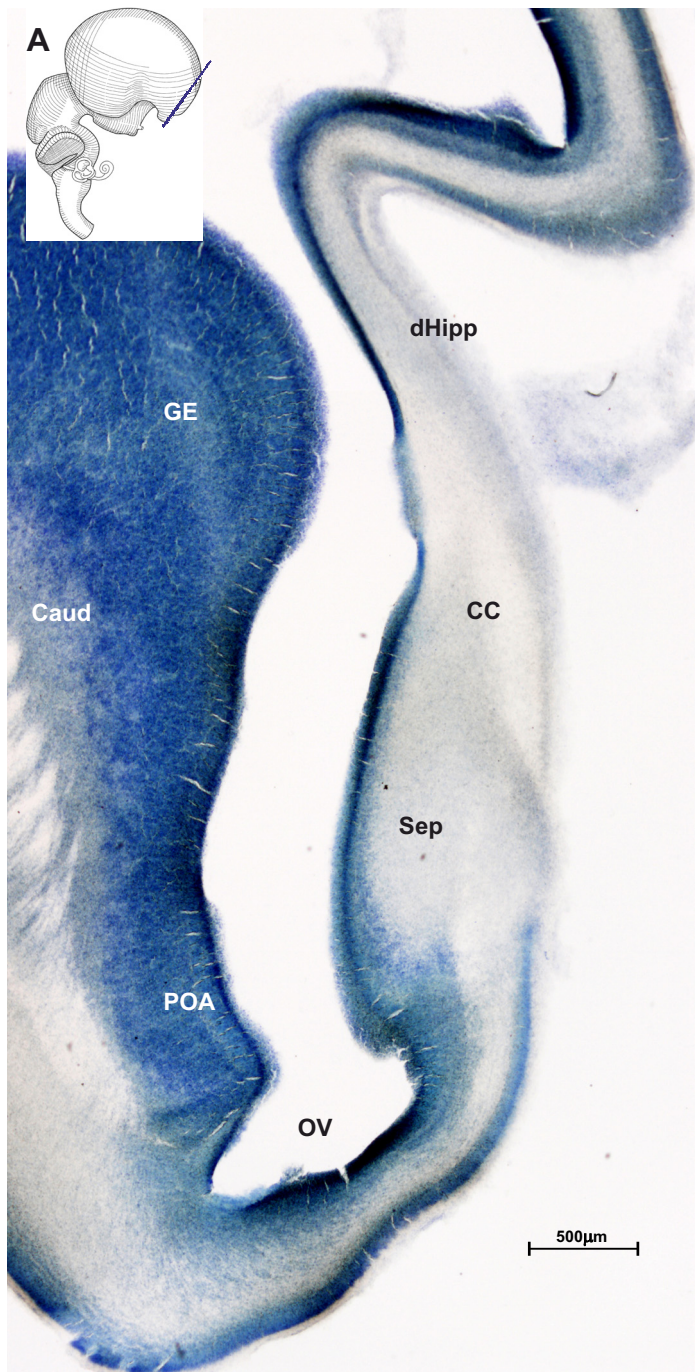
Panel A prikazuje koronalni presjek koji prolazi kroz paleokortikalni ventrikul i septalno područje, na samom početku olfaktornog neuroepitela. Na ovoj razini dominira proliferativna zona bazalnog telencefalona, ganglijski brežuljak, koji se prema ventralno nastavlja u proliferativnu zonu preoptičkog područja. U usporedbi s prethodnim stadijem čini se kako se proliferativna zona bazalnog telencefalona povećala više od palijalne proliferativne zone, osim u septalnom području. Proliferativna zona u vrhu paleokortikalnog ventrikula pokazuje drukčiji obrazac laminacije od septalnih i preoptičkih proliferativnih zona te na ovoj razini nema kontinuiteta. Iznad septalnog područja vidi se osnova komisuralne ploče, iznad koje je dorzalni hipokampus. Većina vlakana unutar komisuralne ploče najvjerojatnije predstavlja osnovu forniksa.

Panel B prikazuje koronalni presjek kroz stražnji dio talamusa. Ventrikularna zona hipotalamusa gusto je ispunjena visoko reaktivnim stanicama. Sličan stupanj reaktivnosti prisutan je i u ventrikularnoj zoni epitalamusa, dok je ventralni dio talamičke zone ispunjen Mash1 reaktivnim stanicama, ali ne tako gusto kao u proliferativnim zonama hipotalamusa i epitalamusa. U talamusu se kroz cjelokupnu stijenku mogu zapaziti Mash1 reaktivne stanice.

**Slika 5.58** Majmun E56, rezovi obojeni Nissl metodom.

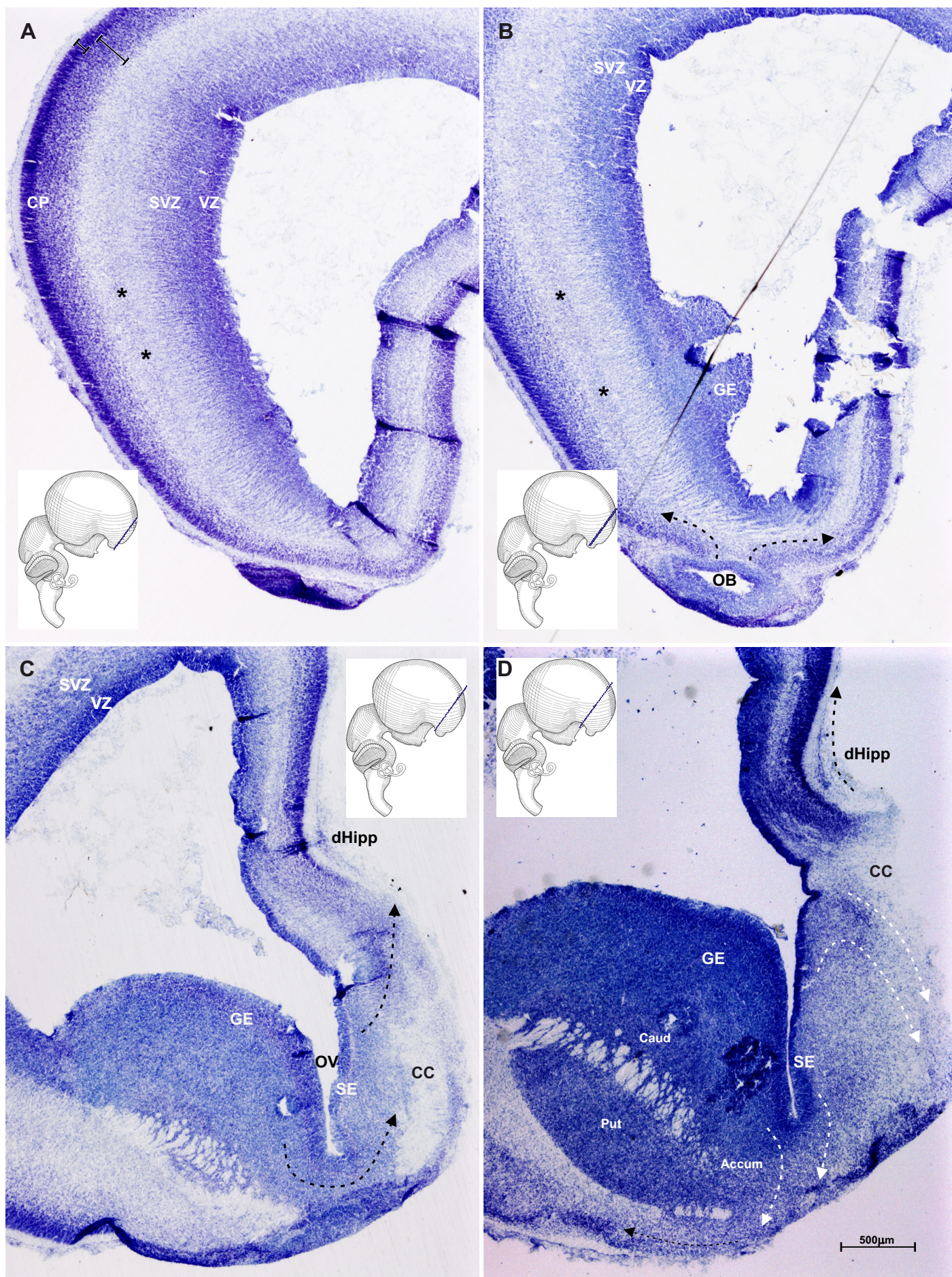
Paneli prikazuju serijske rezove od rostralno prema kaudalno. Panel A prikazuje koronalni presjek kroz vrh frontalnog režnja. U ovom stadiju subventrikularna zona se sastoji od dva dijela, unutarnjeg kompaktnog i vanjskog difuznog. Ventrikularna zona je 2-3 puta tanja od unutarnjeg kompaktnog sloja subventrikularne zone, dok je vanjski difuzni dio subventrikularne zone u nekim dijelovima deblji od unutarnjeg kompaktnog dijela. Gustoća stanica u subventrikularnoj zoni smanjuje se od klijetke prema površini. Intermedijalna zona šira je u lateralnim i dorzalnim dijelovima telencefalona te joj je širina jednaka širini proliferativnih zona. U ventro-lateralnim dijelovima stijenke u sredini intermedijalne zone vidljiv je sloj gušće poredanih stanica (zvjezdica, A i B) koji intermedijalnu zonu u ovom području dijeli na unutarnji (prema subventrikularnoj zoni) i vanjski dio (prema kortikalnoj ploči). U rostralnim dijelovima telencefalona vidljivo je razrjeđenje kortikalne ploče: dublji razrjeđeni dio u dorzalnim dijelovima širinom i do dva puta premašuje kondenzirani, a granica između ta dva dijela kortikalne ploče je oštra, kao i granica prema intermedijalnoj zoni. Panel B prikazuje koronalni presjek kroz olfaktorni tuberkul i na kojem se nazire početak ganglijskog brežuljka. Stanice olfaktornog epitela nastavljaju se prema lateralnom i medijalnom telencefaličkom zidu u razrjeđeni dio kortikalne ploče (isprekidane strelice). Na presjeku neposredno iza olfaktornog tuberkula (C) vidljiv je kontinuitet stanica od granice ganglijskog brežuljka prema septalnom području odakle se stanični niz nastavlja dorzalno





**Slika 5.57** Majmun E52, rez obojen Nissl metodom (A) i rez obrađen imunohistokemijski na Mash1 (B).





**Slika 5.58** Majmun E56, rezovi obojeni Nissl metodom.



prema osnovi hipokampusa (isprekidane strelice). Na presjeku u razini početka komisuralne ploče i rostralnog dijela dorzalnog hipokampusa (D) još je jasno vidljiv paleokortikalni ventrikul. Vidljiv je kontinuitet akumbensa sa substantiom inominatom gdje je smještena i Meynertova bazalna jezgra. Subkalozalno je proliferativna zona septuma u kontinuitetu s ventrikularnom zonom dorzalnog dijela medijalnog telencefaličkog zida.

**Slika 5.59** Majmun E56, rezovi obojeni Nissl metodom.

Panel A prikazuje koronalni presjek nešto kaudalniji od presjeka na slici 5.58D. Ispod korpus kalozuma medijalno prema septumu vide se vlakna forniksa. Bazalni dio površine telencefalona jasno se histološki može razgraničiti od lateralne stijenke. Na presjeku kroz interventrikularni otvor (B) kaudatus i putamen su u potpunosti odvojeni. Počinje se nazirati osnova amigdala, koja se uz stanice bazalnog telencefalona nastavlja u nakupinu stanica koja se proteže od kortikane ploče do putamena i dalje u lateralnu stijenku, gdje se polako stapa s kortikalnom pločom (isprekidana strelica). Na ovoj razini ne može se jasno uočiti razrjeđenje kortikalne ploče. Neposredno iza interventrikularnog otvora (C) subkalozalno se vidi osnova pločice, lamina affixa, koja se ispod forniksa nastavlja i povezuje s dorzalnom stijenkom talamusa (vrh strelice). Vidljivo je i gangliotalamičko tijelo (strelica). Na koronalnom presjeku kroz talamički držak i prednji dio talamusa (D) prikazan je dorzo-medijalni dio telencefalona.

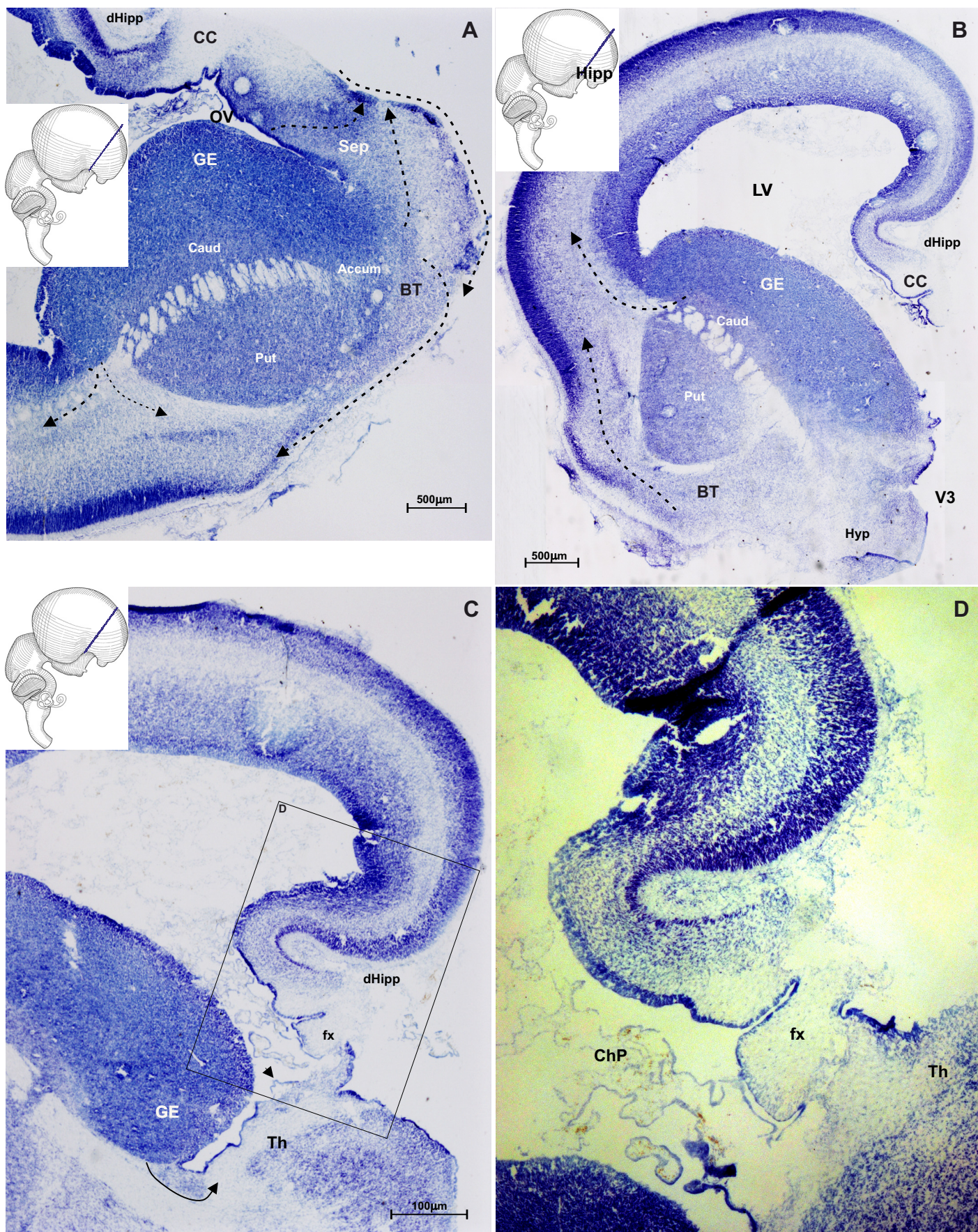
**Slika 5.60** Majmun E56, rezovi obojeni Nissl metodom. Panel A prikazuje uvećani dio presjeka prikazanog na slici 5.59D, a točna pozicija prikaza označena je pravokutnikom na umanjenom presjeku reza.

Unutar medijalnog zida koji se proteže prema koroidnom spletu (A), vide se stanice razbacane između snopova aksona te između neuroepitela i aksona (strelice).

Panel B prikazuje gornji dio kortikalne ploče i marginalnu zonu dorzolateralnog dijela telencefaličkog zida. Marginalna zona je jasno strukturirana te se sastoji od podsloja malih zrnatih stanica poredanih u 1 do 2 reda ispod pije. Unutar tog podsloja nalaze se veće horizontalno orijentirane unipolarne stanice slabijeg intenziteta Nissl bojenja koje odgovaraju morfologiji ranih Cajal-Retziusovih stanica (strelica). U ostatku marginalne zone sporadično se mogu uočiti stanice koje migriraju iz kortikalne ploče. Ove stanice su često poredane kao u lancu. Granica marginalne zone prema kortikalnoj ploči je valovita.

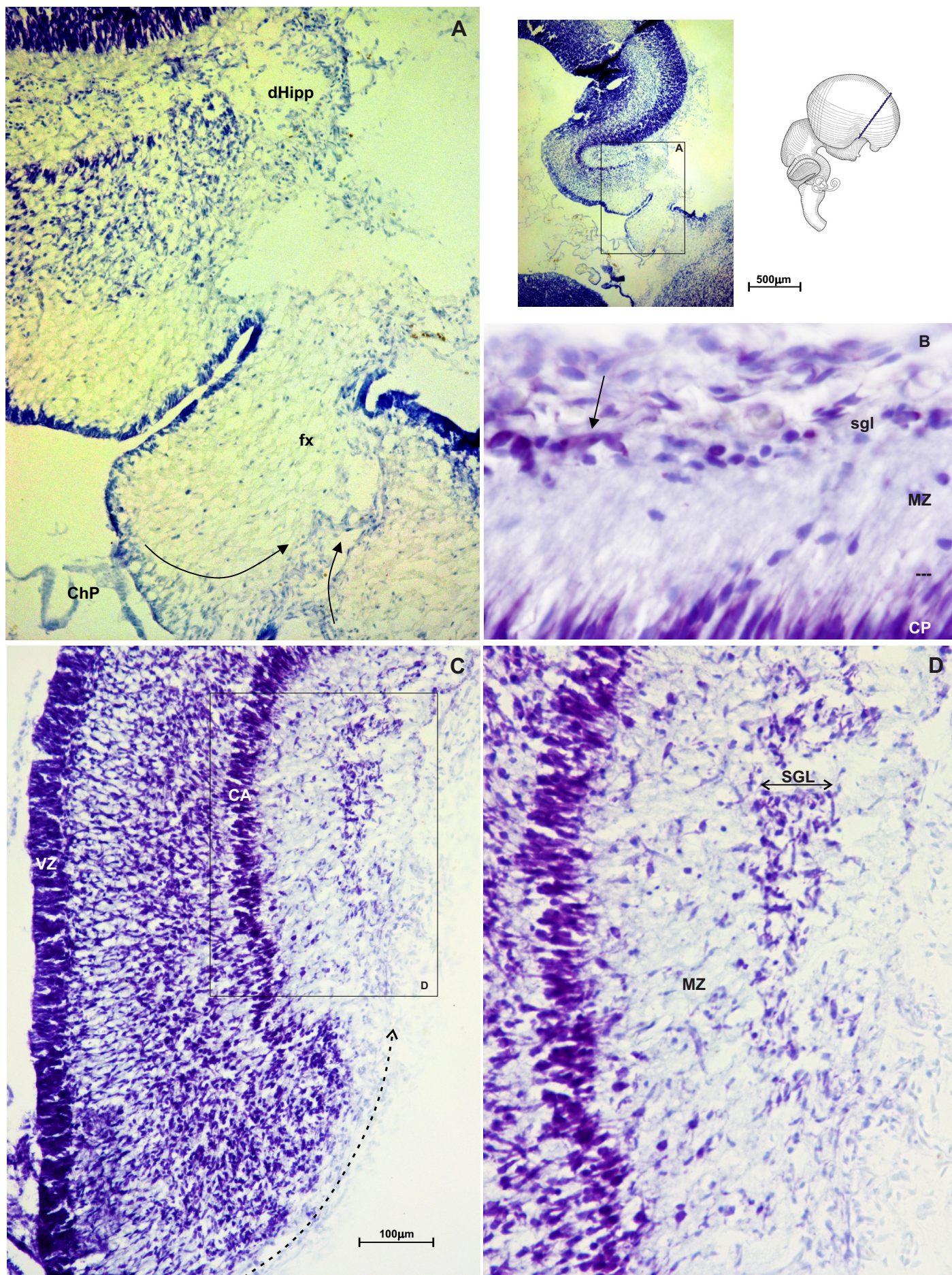
U području dorzalnog hipokampusa dobro je razvijena hipokampalna ploča (C). Subpijalno u marginalnoj zoni vide se nagomilane unipolarne migratorne stanice koje nisu u kontinuitetu s hipokampalnom pločom (D), što ukazuje da imaju porijeklo u rostralnim ili kaudalnim dijelovima (isprekidana strelica, C).





**Slika 5.59** Majmun E56, rezovi obojeni Nissl metodom.





**Slika 5.60** Majmun E56, rezovi obojeni Nissl metodom. Panel A prikazuje uvećani dio presjeka prikazanog na slici 5.59D, a točna pozicija prikaza označena je pravokutnikom na umanjenom presjeku reza.



**Slika 5.61** Majmun E56, rezovi obojeni Nissl metodom.

Na koronalnom presjeku kroz talamički držak i prednji dio talamusa vidljiv je vrh temporalnog roga lateralnih klijetki i amigdaloidni kompleks. Stanice amigdaloidnog kompleksa su u kontinuitetu kroz kapsulu internu prema diencefalonu. Ventro-medijalno smješteni otočići (vrhovi strelice, A) odgovaraju piriformnom korteksu i prema lateralno se nastavljaju u kortikalnu ploču. Između amigdaloidnog kompleksa i putamena prema kortikalnoj ploči vidljiv je širok sloj gusto popunjen stanicama (zvjezdica, A), koji najvjerojatnije odgovara osnovi klaustruma, ali nije isključeno da se radi o migraciji stanica iz bazalnog telencefalona. Kaudalnije, vidljiv je kontinuitet dorzalnog hipokampusa prema talamusu (B), ali i diskretan spoj ganglijskog brežuljka prema talamusu koji može odgovarati gangliotalamičkom tijelu (vrh strelice, C). Moguće je da se radi i o stanicama koje nastaju od neuroepitela medijalnog zida koji se proteže od ganglijskog brežuljka.

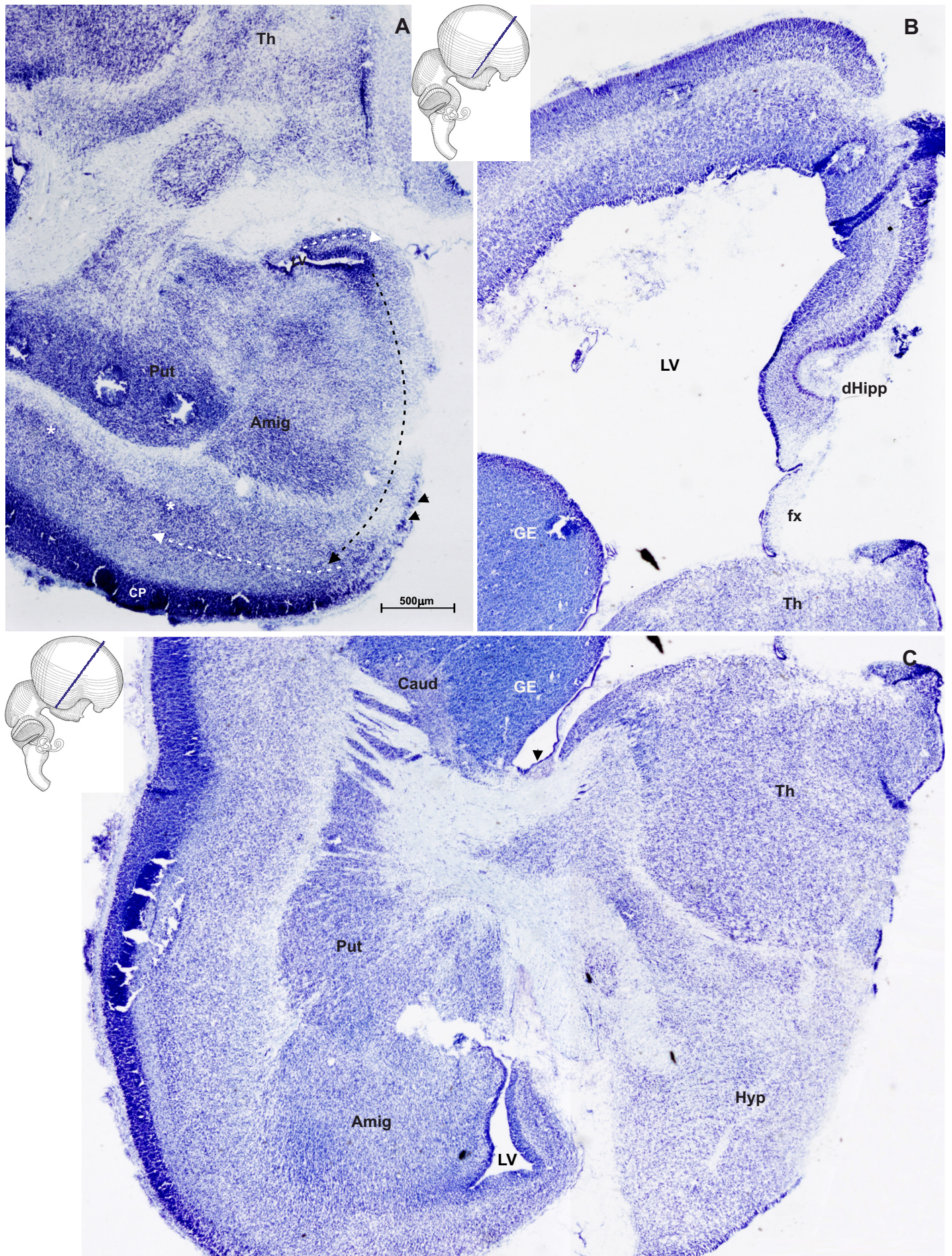
**Slika 5.62** Majmun E56, rezovi obojeni Nissl metodom. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli B-D.

Na koronalnom presjeku kroz stražnji dio talamusa (A) vidljiv je kontinuitet epitela ventralnog i dorzalnog hipokampusa prema talamusu što je uvećano prikazano na panelima B-D. Isprekidane strelice označavaju potencijalne puteve migracije stanica. Panel C prikazuje migraciju stanica medijalnog telencefaličkog zida u talamus.

**Slika 5.63** Majmun E56, rezovi obojeni Nissl metodom.

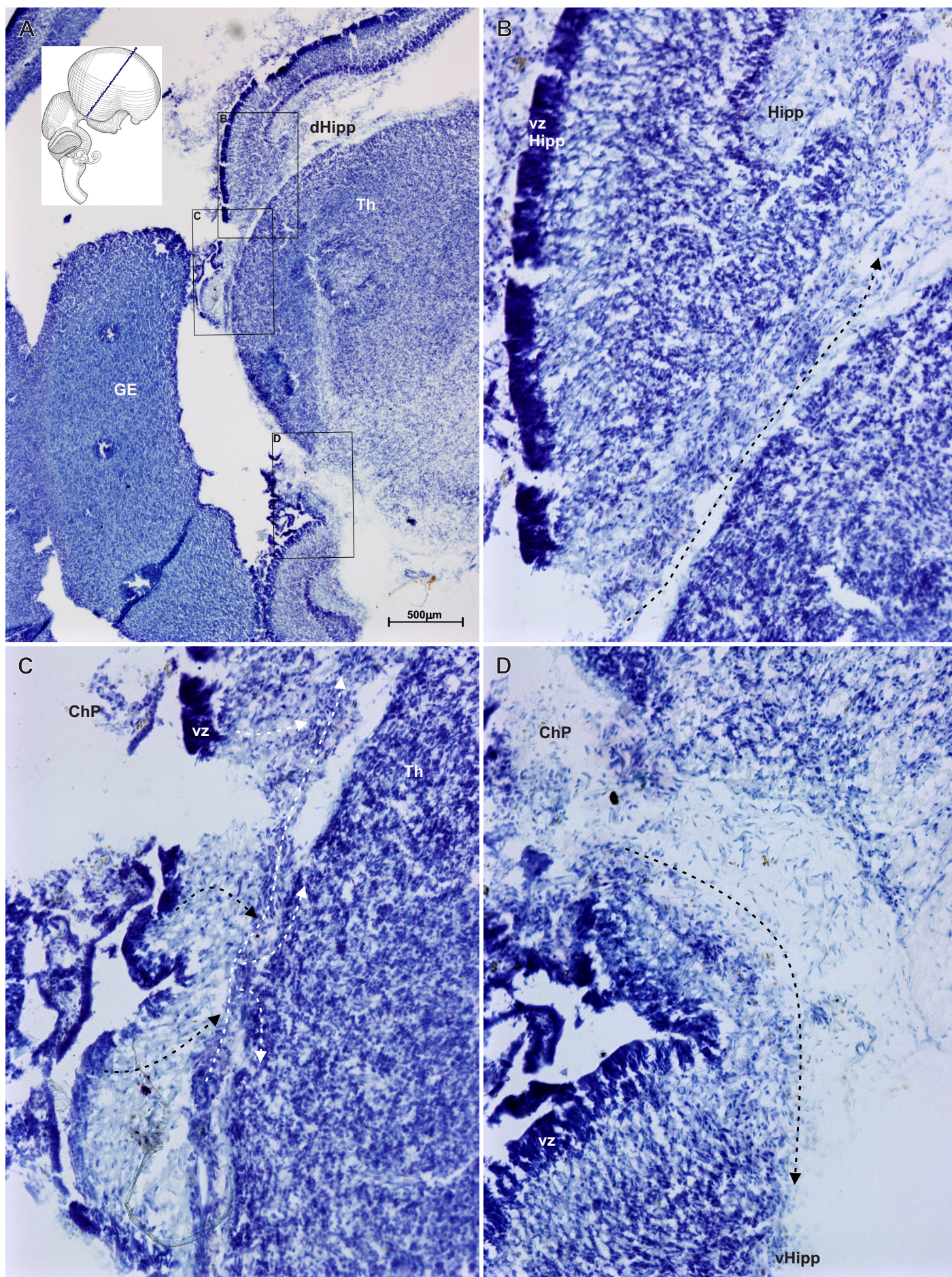
Panel A prikazuje koronalni presjek kroz stražnji dio talamusa i kaudalni kraj ganglijskog brežuljka. Na ovom presjeku gotovo da je došlo do spajanja ventralnog i dorzalnog hipokampusa. Na panelu B postoji kontinuitet ventralnog i dorzalnog hipokampusa, ali bez kontinuiteta same hipokampalne ploče. Gusto zbijene stanice koje se nalaze iznad proliferativne zone medijalnog dijela telencefaličkog zida usmjerene su između hipokampalnih ploča subpijalno te se difuzno rasipaju prema marginalnoj zoni (isprekidane strelice, uvećano na panelu D). Na razini neposredno iza panela B, na presjeku kroz kaudalni završetak talamusa gdje više nije vidljiv ganglijski brežuljak (C), postoji kontinuitet hipokampalne ploče između ventralnog i dorzalnog hipokampusa. Između ventrikularne zone i hipokampalne ploče nalaze se gusto poredane stanice (vrhovi strelica), daleko više nego u ostalim dijelovima telencefaličkog zida. Iznad hipokampalne ploče neposredno ispod pijalne površine vidi se ovalna nakupina stanica (zvjezdica) koje su na prethodnom panelu bile u kontinuitetu sa stanicama uz proliferativnu zonu.





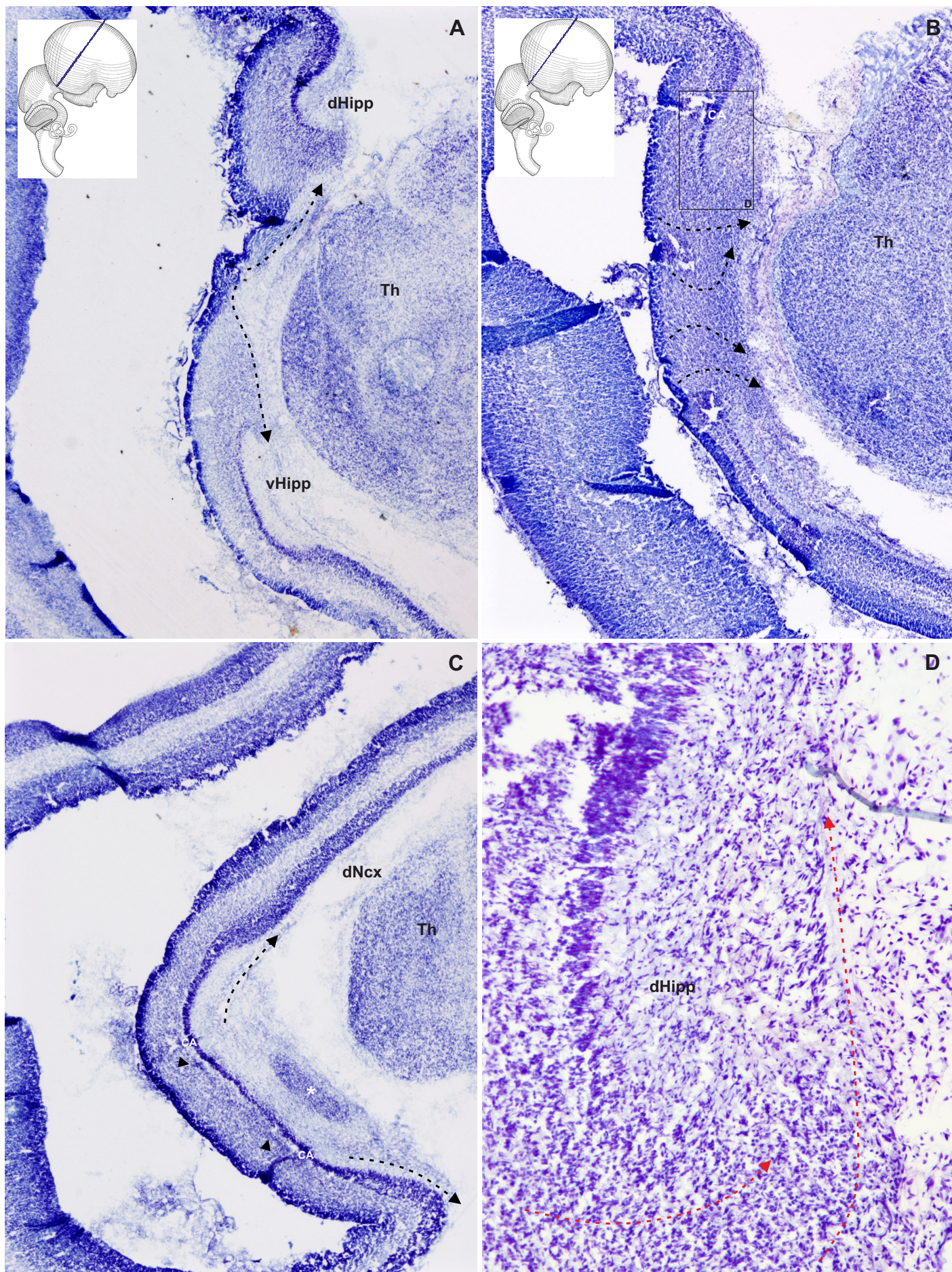
**Slika 5.61** Majmun E56, rezovi obojeni Nissl metodom.





**Slika 5.62** Majmun E56, rezovi obojeni Nissl metodom. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli B-D.





Slika 5.63 Majmun E56, rezovi obojeni Nissl metodom.



### 5.2.1.2 Porijeklo i putevi migracije GABA-ergičkih neurona

Kod majmuna u stadiju E52 rezovi su imunohistokemijski obrađeni monoklinalnim protutijelom na GAD65 i GAD67 te poliklinalnim protutijelom na GAD67 i somatostatin.

GAD reaktivnost vidljiva je u brojnim stanicama telencefaličkih proliferativnih zona i unipolarnim stanicama koje najvjerojatnije predstavljaju buduće GABA-ergičke neurone koji putuju prema svom odredištu. Diferencirane stanice su u ovom stadiju relativno rijetke, ali je u nekim dijelovima velika gustoća reaktivnih aksona. GAD reaktivnost u bazalnom dijelu telencefalona vezana je uz reaktivnost u diencefalonu, što ukazuje da postoje putevi migracije koji su vezani uz prijelaz stanica između ove dvije strukture.

U telencefaličkim proliferativnim zonama koje su izvor telencefaličkih neurona, ganglijski i septalni brežuljak te preoptičko područje, dominira GAD65 reaktivnost (slika 5.64A i 5.64C). Ona je odraz intenzivne reaktivnosti gusto zbijenih okruglih stanica subventrikularne zone, dok se u ventrikularnoj zoni reaktivne stanice nalaze sporadično te su uglavnom radijalno orijentirane. Ovakav obrazac reaktivnosti istovjetan je onome opisanom u stadiju E48. U većini navedenih područja stanice uglavnom ne pokazuju jaču GAD67 reaktivnost (slika 5.64B i 5.64D). Značajnije GAD67 reaktivnosti nema u subkortikalnim strukturama koje pokazuju visoku razinu ekspresije GAD65, kao strijatum i septum. Iznimku jednim dijelom predstavlja bazalna jezgra koja je GAD65 reaktivnim mostićima povezana sa akumbensom i dalje se nastavlja prema bazalnom korteksu (slika 5.65) gdje je prisutna i intenzivna GAD67 reaktivnost (slika 5.70A). Istovremena GAD65 i GAD67 reaktivnost prisutna je i u većem dijelu stanica u području amigdala.

Iz lateralnog ganglijskog brežuljka u subventrikularnu zonu lateralnog telencefaličkog zida (palijo-subpalijalna granica) ulazi masa migratornih unipolarnih GAD65 reaktivnih stanica koje ne izražavaju GAD67 (slika 5.66A). Njihova je gustoća na samom početku lateralne stijenke izrazito visoka, ali se prema dorzalno polako smanjuje (slika 5.66B). No, najveća gustoća GAD65 reaktivnih stanica je u marginaloj zoni, posebno na granici s kortikalnom pločom, uključujući i sam vrh kortikalne ploče (slika 5.66C). U ovom graničnom području značajan dio stanica ima obilježja diferenciranih neurona. U donjoj polovici kortikalne ploče također se vidi značajan broj GAD65 reaktivnih stanica, dominantno unipolarne migratorne morfologije.

Iz guste nakupine GAD65 reaktivnih stanica koja ispunjava veći dio septuma nastavlja se tračak prema pijalnoj površini gdje je zona posebno intenzivne reaktivnosti, koja se smanjuje prema ventralno (slika 5.65A). GAD65 reaktivni nastavci koji bi mogli odgovarati migratornim stanicama vidljivi su i u području forniksa (slika 5.66D).

U sredini rostralnog dijela medijalnog telencefaličkog zida, ispred osnove hipokampusa i kalozalne ploče, u proliferativnoj zoni vide se nakupine intenzivno reaktivnih

GAD67 pozitivnih stanica koje se protežu prema piji gdje se nagomilavaju i poprimaju jasnu unipolarnu migratornu morfologiju (slika 5.67). Ove reaktivne stanice su prema ventralno i dorzalno u kontinuitetu s gusto poredanim stanicama u marginalnoj zoni, što ukazuje da se radi o stanicama koje se stvaraju u tom području i migriraju kroz marginalnu zonu.

Na istoj razini (slika 5.68A) se ispod pije vide nagomilane somatostatinske unipolarne stanice migratorne morfologije koje su u kontinuitetu prema ventralno i dorzalno (slika 5.68B). U lateralnom dijelu stijenke u marginalnoj zoni vide se gusto poredani brojni somatostatinski horizontalno orijentirani kraći nastavci i unipolarne migratorne stanice s kraćim nastavcima. U donjem dijelu kortikalne ploče i ispod kortikalne ploče vidljive su horizontalno orijentirane stanice s dugim nastavcima i jasno prisutnom reaktivnosti u samom tijelu stanice, što ukazuje kako se radi o stanicama koje ulaze u proces diferencijacije (slika 5.68C i 5.68D). Nakupine ovih reaktivnih stanica jasno su razdvojene u dvije zone, jednu na donjem rubu kortikalne ploče i drugu ispod prozirnog sloja koji se nalazi neposredno ispod kortikalne ploče (slika 5.68E). Ovakav obrazac distribucije u lateralnom telencefaličkom zidu vidljiv je u rostralnim dijelovima te odgovara distribuciji i morfologiji GAD67 reaktivnih stanica.

Na kaudalnim razinama vidljiva su područja veće GAD67 reaktivnosti nego u rostralnim dijelovima telencefalona. Ove stanice mogu potjecati od GAD67 reaktivnih kaudalnijih proliferativnih zona u ventralnom dijelu prema i u samom medijalnom telencefaličkom zidu, no nije bilo GAD67 obrađenih raspoloživih rezova na ovoj razini koji bi to izravno potvrdili. No, GAD65 reaktivnost u ovom dijelu i usmjeravanje stanica prema bazalnom telencefalonu (slika 5.69) ukazuje da je i u ovom stadiju kaudalni dio ventralnog telencefalona, koji je izvan ganglijskog brežuljka, izvor GAD67 reaktivnih migratornih stanica.

Najveći intenzitet GAD67 reaktivnosti vidljiv je u najventralnijem dijelu telencefalona i susjednim djelovima medijalnog i lateralnog telencefaličkog zida (slika 5.70). U lateralnoj stijenci telencefalona vidljiva su tri migratorna puta (engl. *stream*) GAD67 reaktivnih stanica (slika 5.71). Gusto poredane stanice tvore tanak sloj u marginalnoj zoni, a ispod kortikalne ploče nalazi se deblji sloj gusto poredanih i intenzivno reaktivnih GAD67 stanica. Ova dva sloja su u ventralnom dijelu nerazdvojena što ukazuje kako se radi o migratornim stanicama koje potječu iz istih područja i zatim se razdvajaju te putuju kroz dvije različite zone neposredno ispod i iznad kortikalne ploče. Kroz cijelu marginalnu zonu GAD67 reaktivne stanice su pravilno poredane i imaju drukčiju laminarnu distribuciju od GAD65 stanica koje su smještene u graničnom području s kortikalnom pločom. Ovo ukazuje da GAD67 reaktivne migratorne stanice koje se nalaze u marginalnoj zoni i zoni ispod kortikalne ploče ne potječu od stanica u proliferativnim zonama gdje nema GAD67 reaktivnosti, gdje proliferativne stanice isključivo izražavaju GAD65.

Za razliku od toga, GAD67 reaktivne stanice koje se mogu zapaziti u gornjem dijelu subventrikularne i donjem dijelu intermedijalne zone, mogu odgovarati i stanicama koje

potječu iz ganglijskog brežuljka gdje nema GAD67 pozitivnih proliferativnih stanica. Moguće je da populacije budućih GABA-ergičkih neurona i progenitora koje potječu iz ovih područja prvo izražavaju GAD65, a kasnije tijekom migracije počinju izražavati GAD67. To upućuje da se na temelju ekspresije GAD izoforme mogu razlikovati područja gdje progenitori i migrirajuće stanice izražavaju samo GAD65, od područja gdje većina progenitora i migratornih stanica ima jaku ekspresiju GAD67.

Srednje do intenzivno reaktivne radijalno orijentirane stanice mogu se zapaziti i u kortikalnoj ploči. U intermedijalnoj zoni sporadično se vide slabo reaktivne GAD67 pozitivne stanice radijalne orijentacije, što ukazuje na migraciju od subventrikularne zone prema kortikalnoj ploči.

U kaudalnom dijelu telencefalona gdje se nalaze brojne GAD67 reaktivne stanice mogu se, kao i na rostralnim razinama (slika 5.66), uočiti brojne somatostatin reaktivne stanice (slika 5.72). Na ovoj razini se u ventralnom dijelu medijalnog telencefaličkog zida nalaze gusto poredane somatostatinske stanice koje se prema ventralno nastavljaju ispod pije u marginalnu zonu. Ovo ukazuje da somatostatinske stanice u ranom fetalnom razdoblju čine značajan dio, a možda i cjelokupnu populaciju GABA-ergičkih neurona koji potječu iz GAD67 reaktivnih zona telencefalona.



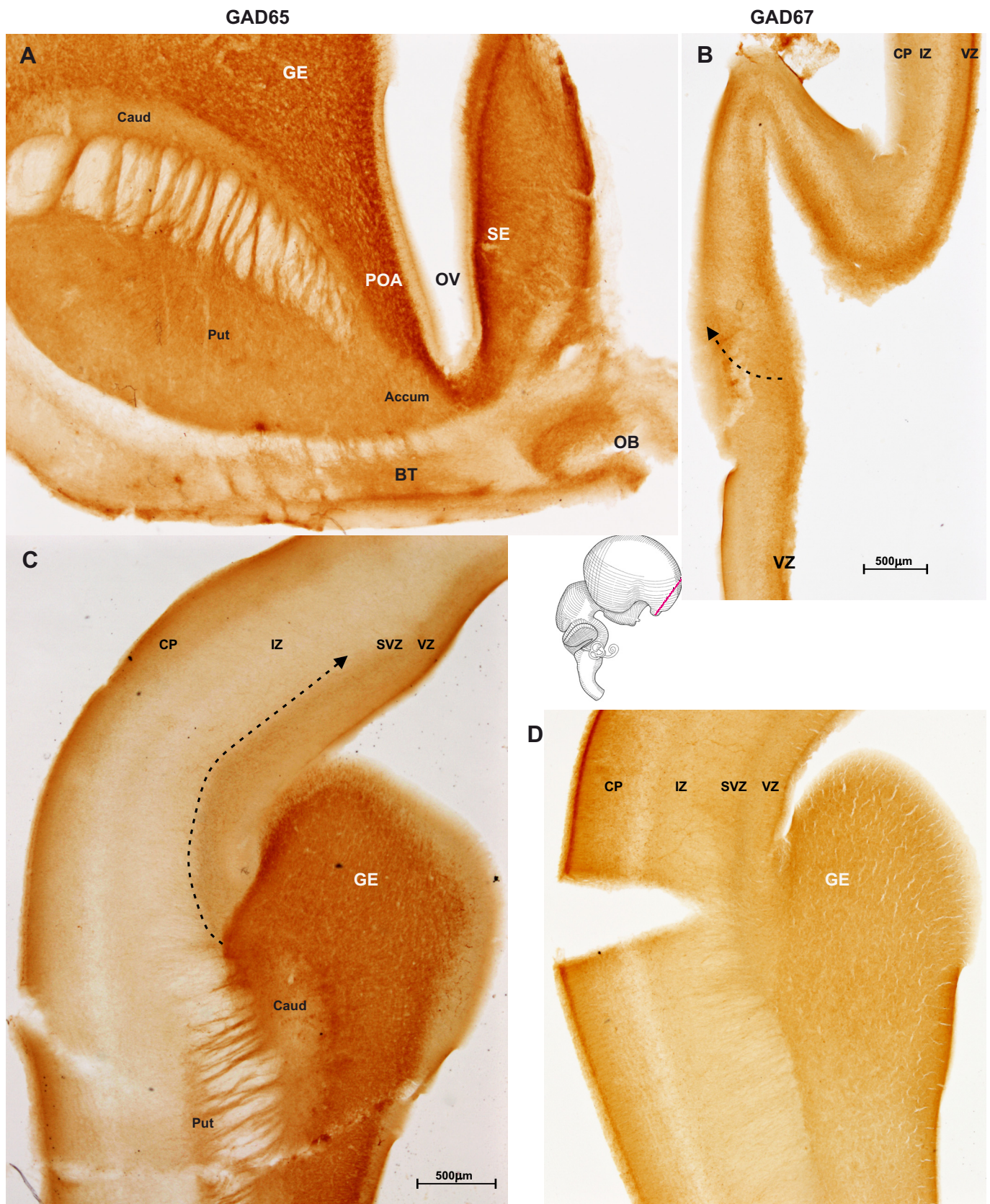
## Deskriptivna analiza GAD65, GAD67 i somatostatinskih rezova

**Slika 5.64** Majmun E52, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD65 (A, C) i GAD67 (B, D).

Na koronalnom presjeku u razini paleokortikalnog ventrikula i septalnog područja, na rostralnom dijelu olfaktornog neuroepitela, lateralni dio ganglijskog brežuljka nastavlja se ventralno u proliferativnu zonu preoptičkog područja koja je samo na ovoj razini u kontinuitetu sa septumom (A). U proliferativnim zonama ovih područja GAD65 intenzivno reaktivne stanice gusto su poredane u subventrikularnoj zoni, dok se u ventrikularnoj nalaze samo sporadično. GAD65 reaktivnost prisutna je kroz cijeli strijatum, uključujući i mostiče sive tvari koji povezuju kaudatus i putamen, kao i u akumbensu koji je reaktivnim mostićima povezan i s GAD65 reaktivnom bazalnom jezgrom te u olfaktornom tuberkulu oko proliferativnih zona. Kroz cjelokupan septum, osim u ventrikularnoj zoni koja je Mash1 reaktivna (slika 5.53), GAD65 reaktivnost prisutna je u intenzitetu kao u ostalim neproliferativnim strukturama koje su GAD65 reaktivne. Iznimka je intenzivno reaktivan sloj neposredno iznad ventrikularne zone koji se prema pijalnoj površini nastavlja u zonu posebno intenzivne reaktivnosti, s gradijentom smanjivanja od dorzalno prema ventralno. U području palio-subpalijalne granice iz ganglijskog brežuljka u subventrikularnu zonu ulazi masa unipolarnih tangencijalno migrirajućih GAD65 reaktivnih stanica (C). Na susjednom rezu obrađenom GAD67 poliklonalnim bojenjem (D), u ganglijskom brežuljku nema GAD67 reaktivnih stanica kao niti migratornih stanica koje napuštaju ganglijski brežuljak. Na presjeku koji prolazi kroz najrostralniji dio dorzalnog hipokampusa (B) iz proliferativne zone središnjeg dijela medijalnog telencefaličkog zida, ispod osnove hipokampusa, intenzivno GAD67 reaktivne unipolarne migratorne stanice protežu se prema piji gdje se nagomilavaju te su i prema ventralno i prema dorzalno u kontinuitetu s gusto poredanim stanicama u marginalnoj zoni i sloju ispod kortikalne ploče.

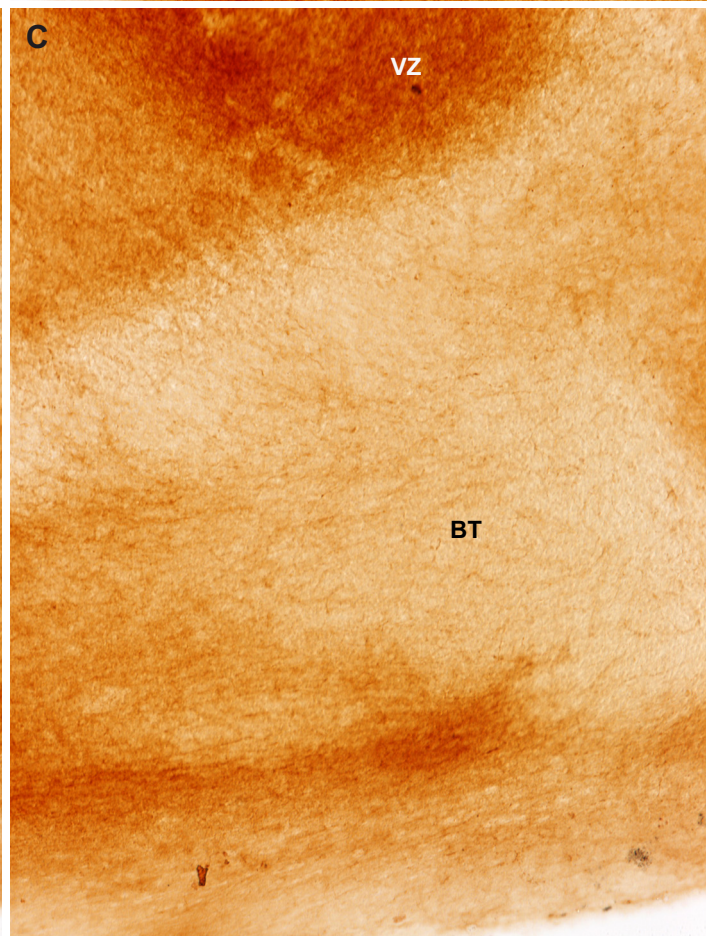
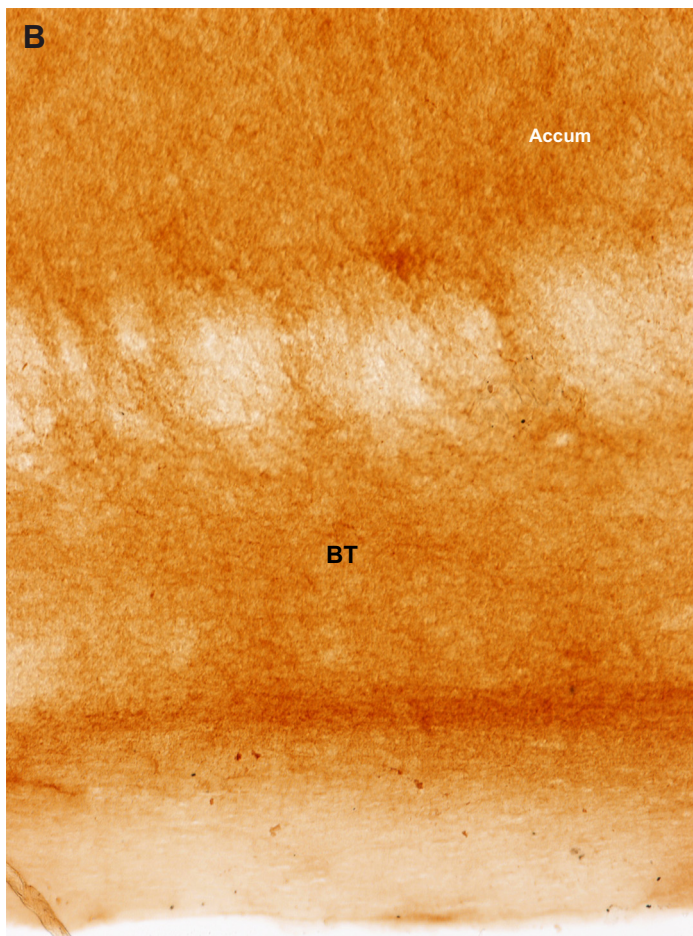
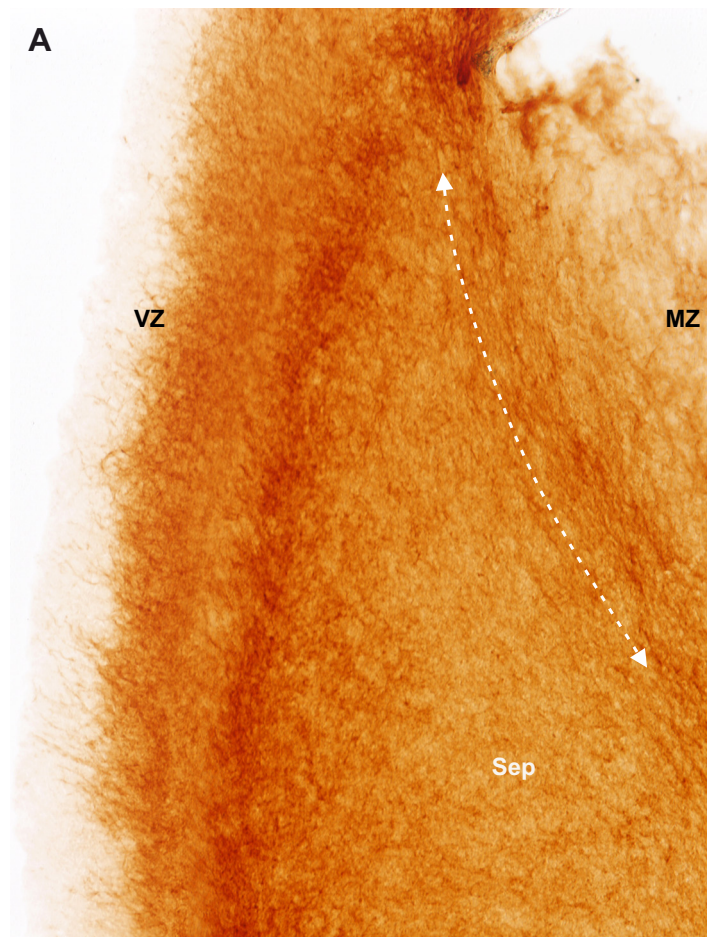
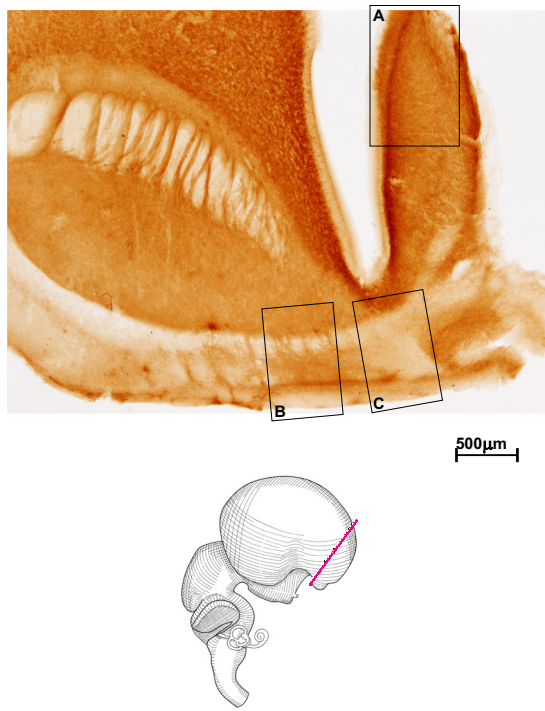
**Slika 5.65** Majmun E52, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD65. Paneli A-C prikazuju uvećane dijelove presjeka prikazanog na slici 5.64A, a točne pozicije prikaza označene su pravokutnicima na umanjenom presjeku reza.

Cjelokupan septum ispunjen je gusto poredanim, intenzivno reaktivnim GAD65 stanicama s nastavcima (A). Stanice su najgušće poredane u sloju neposredno iznad ventrikularne zone. Način bojenja cjelokupnog septuma ukazuje da se ovdje radi o izrazito nagomilanim migratornim stanicama, bez većeg broja vlakana. Stanice su nagomilane u marginalnoj zoni bez jasne orijentacije u ventralnom ili dorzalnog smjeru. Moguće je da je glavni smjer migracije u septumu prema rostralno i kaudalno. GAD65 reaktivnost prisutna je u akumbensu koji je reaktivnim mostićima povezan s GAD65 reaktivnom bazalnom jezgrom



**Slika 5.64** Majmun E52, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD65 (A, C) i GAD67 (B, D).





**Slika 5.65** Majmun E52, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD65. Paneli A-C prikazuju uvećane dijelove presjeka prikazanog na slici 5.64A, a točne pozicije prikaza označene su pravokutnicima na umanjenom presjeku reza.



(B) te u proliferativnim zonama oko vrha paleokortikalnog ventrikula (C). Način bojenja ukazuje da GAD65 reaktivnost prvenstveno odgovara stanicama.

**Slika 5.66** Majmun E52, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD65. Paneli A-D prikazuju uvećane dijelove presjeka prikazanog na slici 5.64C te umanjeno prikazanog na ovoj slici. Pravokutnik na umanjenom presjeku reza uvećano je prikazan kao panel A.

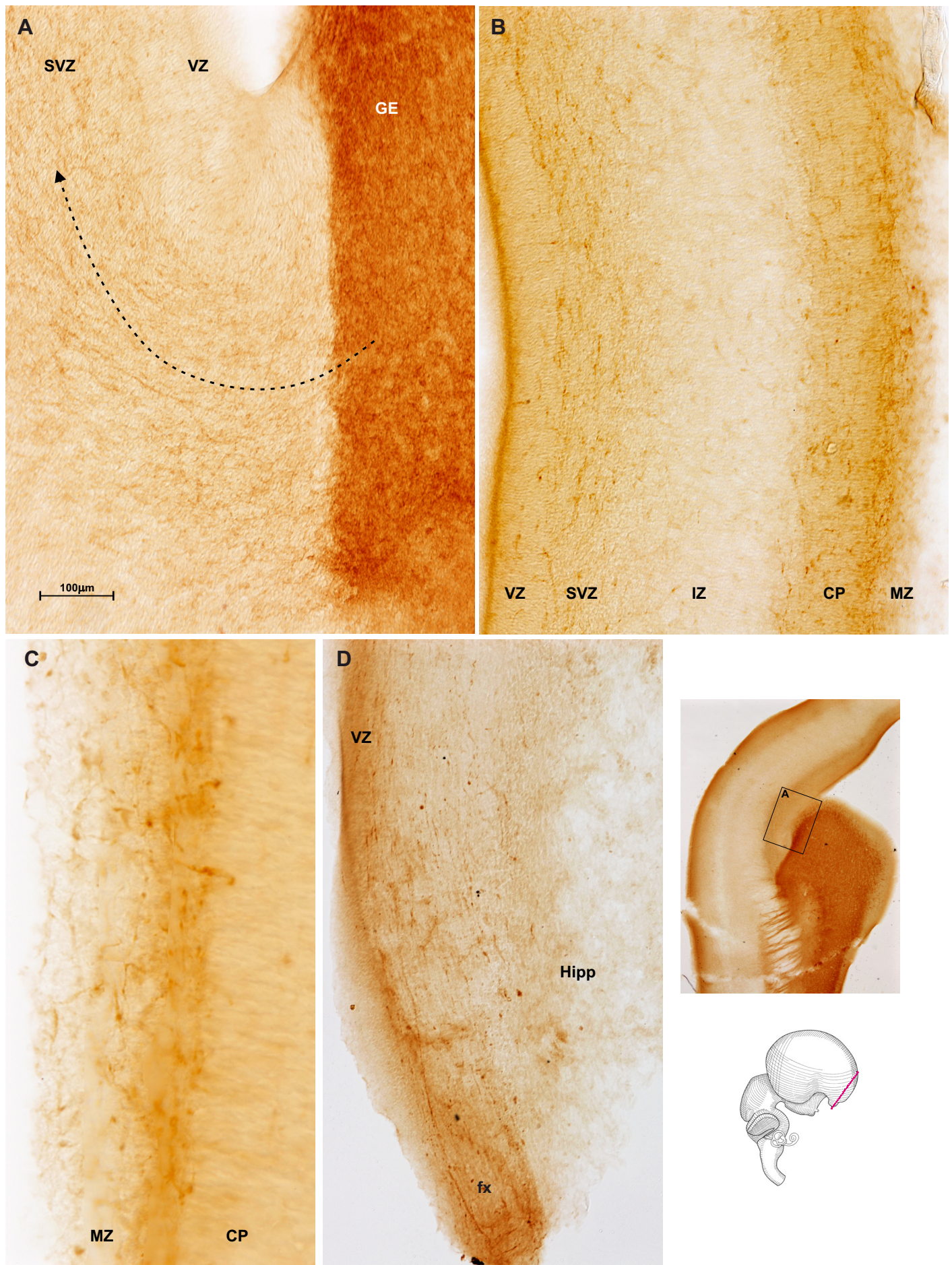
Iz intenzivno reaktivnog ganglijskog brežuljka u subventrikularnu zonu lateralnog telencefaličkog zida ulazi masa migratornih unipolarnih GAD65 reaktivnih stanica (A). U lateralnom telencefaličkom zidu (B) najveća gustoća GAD65 reaktivnih stanica vidljiva je na granici marginalne zone i kortikalne ploče (C). U subventrikularnoj zoni su također prisutne brojne GAD65 reaktivne stanice, a priličan broj stanica vidljiv je i u donjoj polovici kortikalne ploče. Većina ovih stanica je horizontalno orijentirana, unipolarne migratorne morfologije. GAD65 reaktivnost vidljiva je uz ventrikularnu površinu dorzalnog dijela medijalnog telencefaličkog zida (D) i pojačava se prema mjestu gdje se formira foniks. Morfologija ovih nastavaka ukazuje da se radi o dijelu neposredno uz tijelo, dok samo manji dio ovih nastavaka odgovara aksonima.

**Slika 5.67** Majmun E52, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD67. Paneli A-C prikazuju uvećane dijelove presjeka prikazanog na slici 5.64B, a točne pozicije prikaza označene su pravokutnicima na umanjenom presjeku reza.

Iznad proliferativne zone arhi/mezokortikalnog područja brojne, gusto poredane stanice tvore debeli sloj iznad kojeg se vide GAD67 pozitivni nastavci (A). U dorzalnog dijelu medijalnog telencefaličkog zida, prema osnovi budućeg neokorteksa (B), unipolarne horizontalno orijentirane GAD67 reaktivne stanice nalaze se u graničnom dijelu ventrikularne i subventrikularne zone. Za razliku od toga, u sredini medijalnog telencefaličkog zida neposredno ispod komisuralne ploče, nakupina horizontalno orijentiranih, migratornih stanica smještena je bliže pijalnoj površini (C). Ovi podaci ukazuju da dio GABA-ergičkih neurona potječe iz rostro-dorzalnog dijela medijalnog telencefaličkog zida.

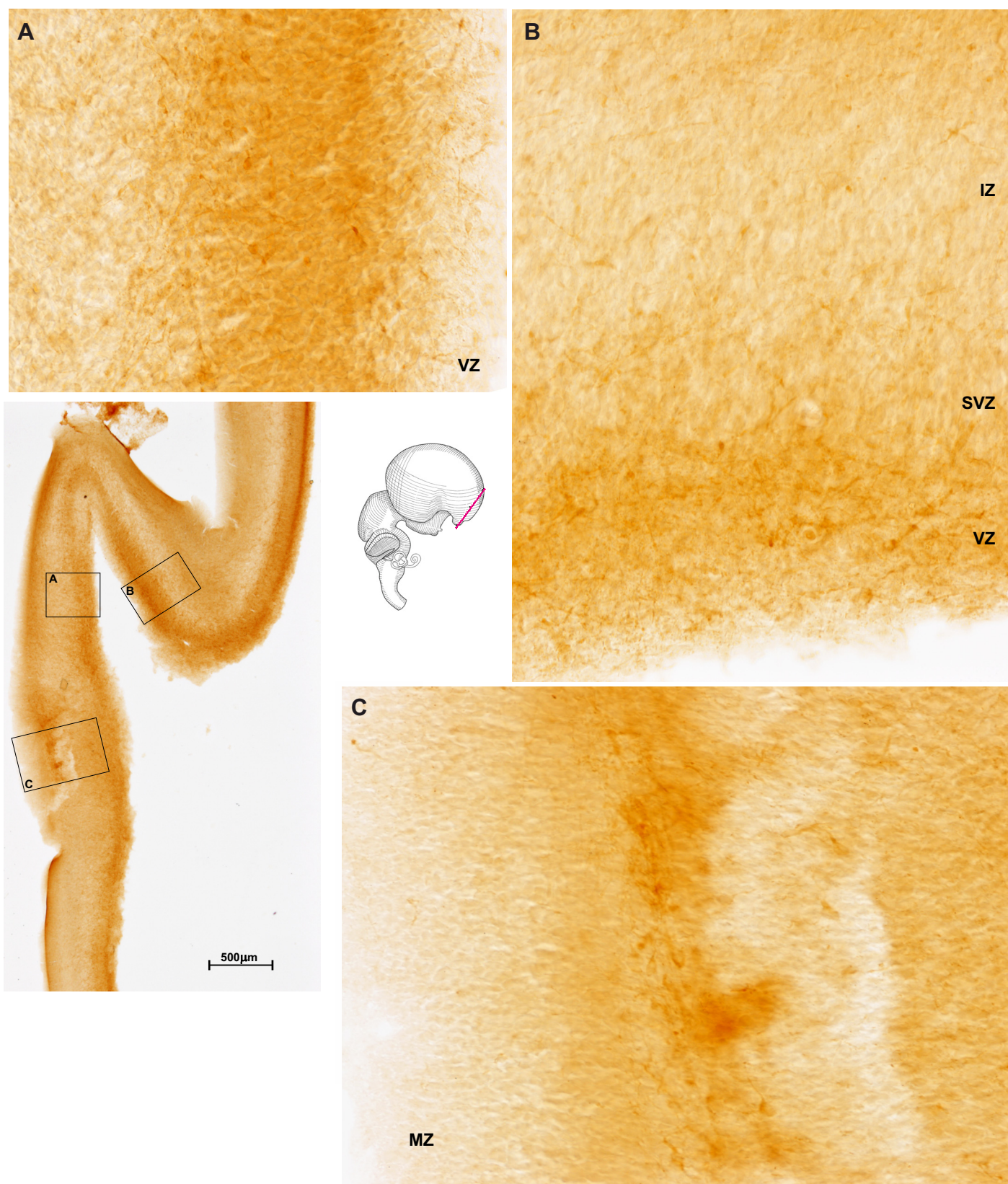
**Slika 5.68** Majmun E52, rezovi obrađeni imunohistokemijski na somatostatin.

Na panelu A prikazan je središnji dio medijalnog telencefaličkog zida koji je rostralna ekstenzija dijela zida gdje se u proliferativnoj zoni nalaze GAD67 pozitivne stanice (slika 5.64B). Ispod pije se vide nagomilane unipolarne somatostatin reaktivne stanice migratorne morfologije koje su u kontinuitetu prema ventralno i dorzalno. Brojni i gusto poredani horizontalno orijentirani nastavci i poneki obris tijela tipičan za bojenje somatostatin reaktivnih stanica nalaze se većinom u gornjoj polovici marginalne zone (B).



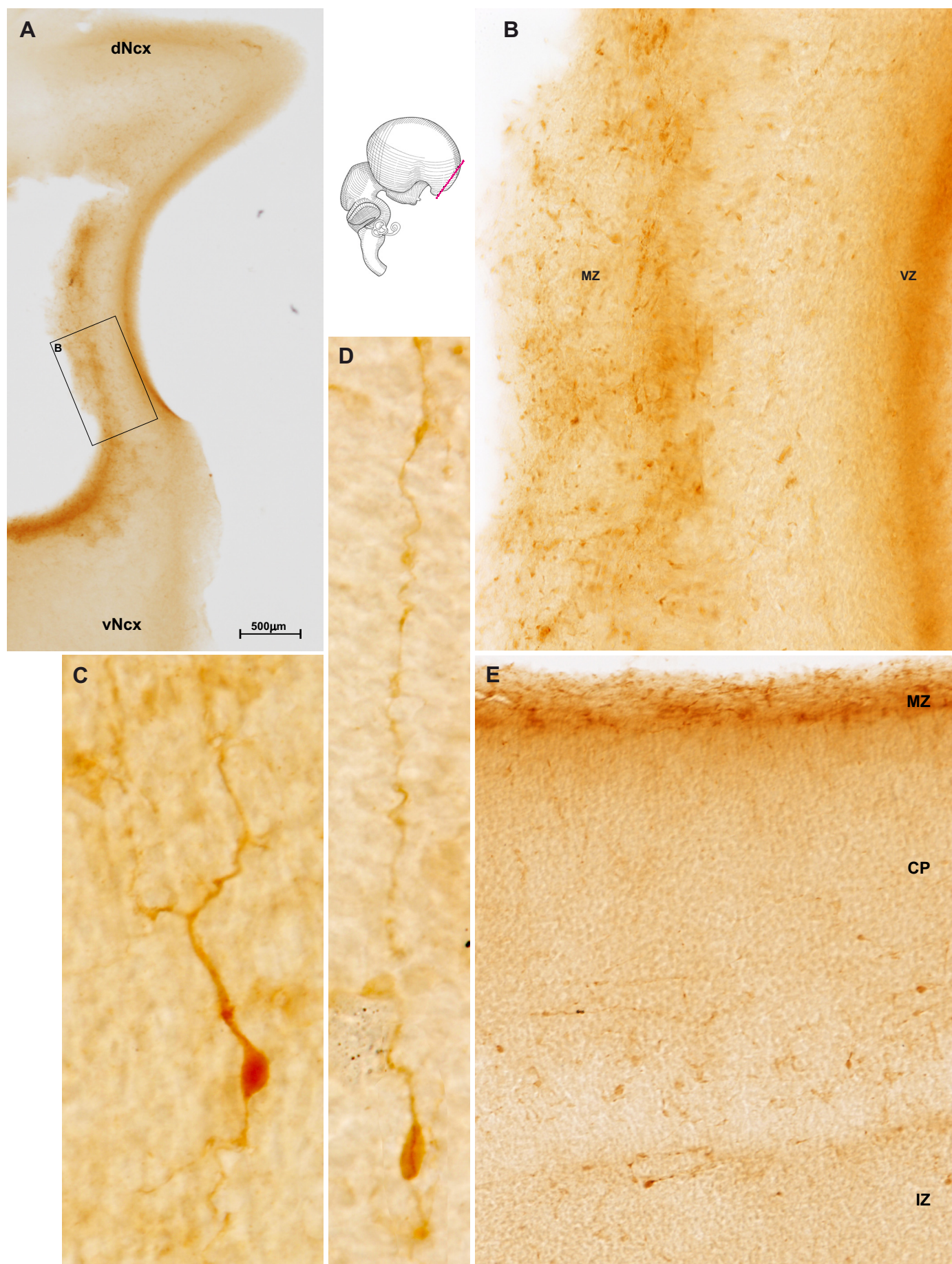
**Slika 5.66** Majmun E52, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD65. Paneli A-D prikazuju uvećane dijelove presjeka prikazanog na slici 5.64C te umanjeno prikazanog na ovoj slici. Pravokutnik na umanjenom presjeku reza uvećano je prikazan kao panel A.





**Slika 5.67** Majmun E52, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD67. Paneli A-C prikazuju uvećane dijelove presjeka prikazanog na slici 5.64B, a točne pozicije prikaza označene su pravokutnicima na umanjenom presjeku reza.





**Slika 5.68** Majmun E52, rezovi obrađeni imunohistokemijski na somatostatin.

Panel E prikazuje najdeblji dio lateralne stijenke telencefalona. U marginalnoj zoni nalaze se brojni, gusto poredani, horizontalno orijentirani kraći nastavci i unipolarne migratorne stanice s kraćim nastavcima. U donjem dijelu kortikalne ploče i ispod prozirnog sloja koji se nalazi neposredno ispod kortikalne ploče vidljive su nakupine horizontalno orijentiranih stanice s dugim nastavcima i jasno prisutnom reaktivnošću u samom tijelu, što ukazuje kako se radi o stanicama koje ulaze u proces diferencijacije. Paneli C i D prikazuju povećani dio zone ispod prozirnog sloja i kortikalne ploče kako bi se prikazale reaktivne stanice. Poneke stanice su dobro diferencirane s razgranatim dendritom i dužim aksonom (C). Većina stanica ima horizontalnu morfologiju s jednim dugačkim nastavkom koji ima obilježja dendrita i drugim kratkim koji izlazi na suprotnoj strani tijela i ima obilježja aksona, s rastućim čunjićem („growth cone“) na vrhu (D). Ovakve stanice prisutne su i u prethodnom stadiju.

**Slika 5.69** Majmun E52, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD65.

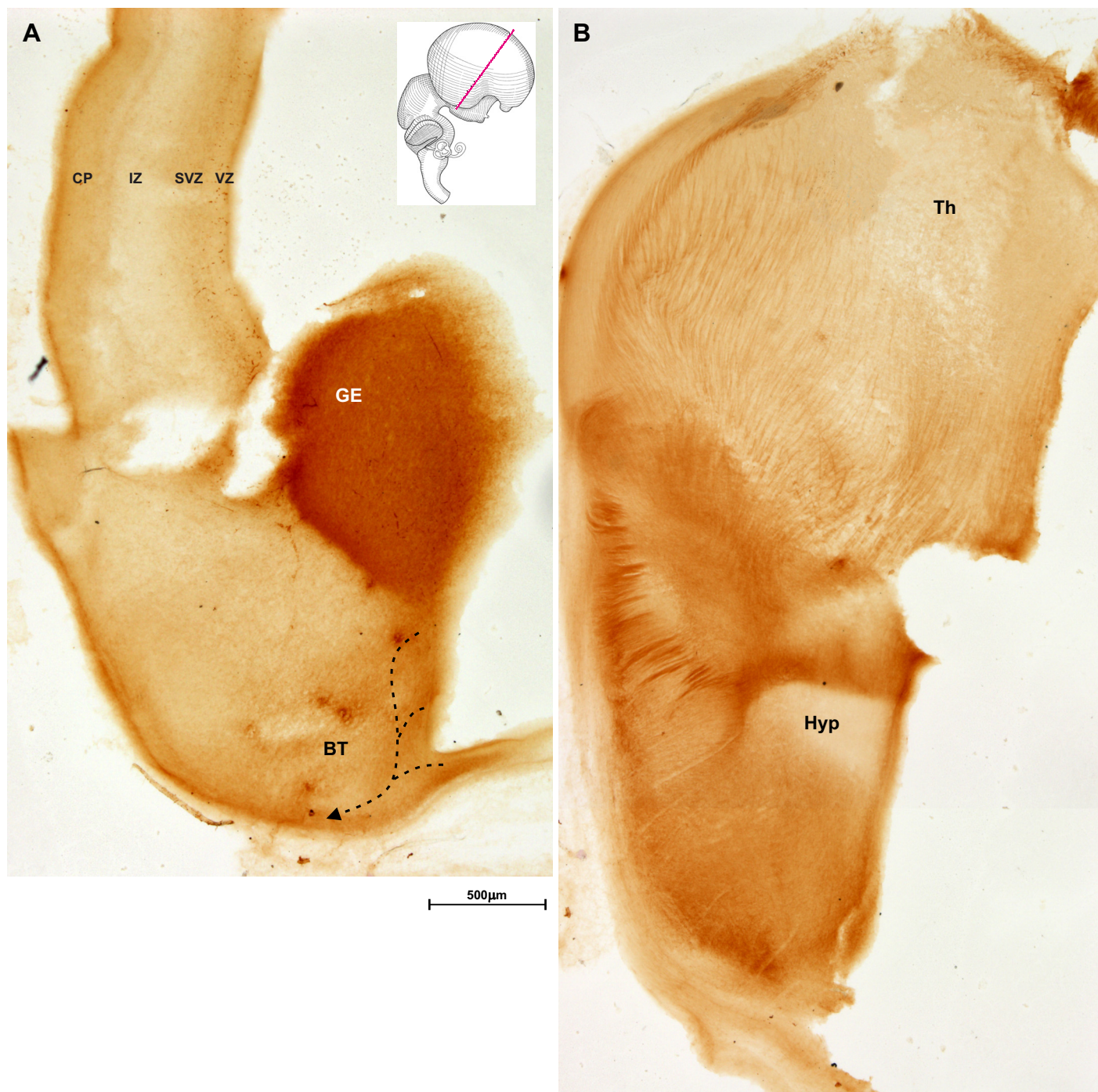
Panel A prikazuje koronalni presjek kroz kaudalni dio ganglijskog brežuljka. Intenzivna GAD65 reaktivnost prisutna je u subventrikularnoj zoni ganglijskog brežuljka. Blaža reaktivnost vidljiva je i u preostalom dijelu proliferativne zone koja se proteže ventralno i zatim u medijalni zid. U ovoj je zoni posebno je intenzivna GAD67 reaktivnost u prethodnom stadiju (slika 5.40A), od kuda se migratorne stanice nastavljaju prema površini bazalnog telencefalona. U odnosu na prethodni stadij, na koronalnom presjeku kroz stražnji dio talamusa i hipotalamus, nema jasne GAD65 reaktivnosti u stanicama, već se reaktivnost uglavnom odnosi na vlakna. Više reaktivnosti prisutno je u hipotalamusu (B).

**Slika 5.70** Majmun E52, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD67.

Paneli A i B prikazuju koronalni presjek kroz telecefalon u razini srednjeg dijela talamusa. Iz ventralnog dijela telencefalona GAD67 reaktivne stanice usmjerene su prema intermedijalnoj zoni lateralne stijenke. Intenzivna reaktivnost vidljiva je i u marginalnoj zoni. U ganglijskom brežuljku i strijatumu nema GAD67 reaktivnosti, a nema ni GAD67 reaktivnih stanica koje iz ganglijskog brežuljka ulaze u lateralnu stijenku.

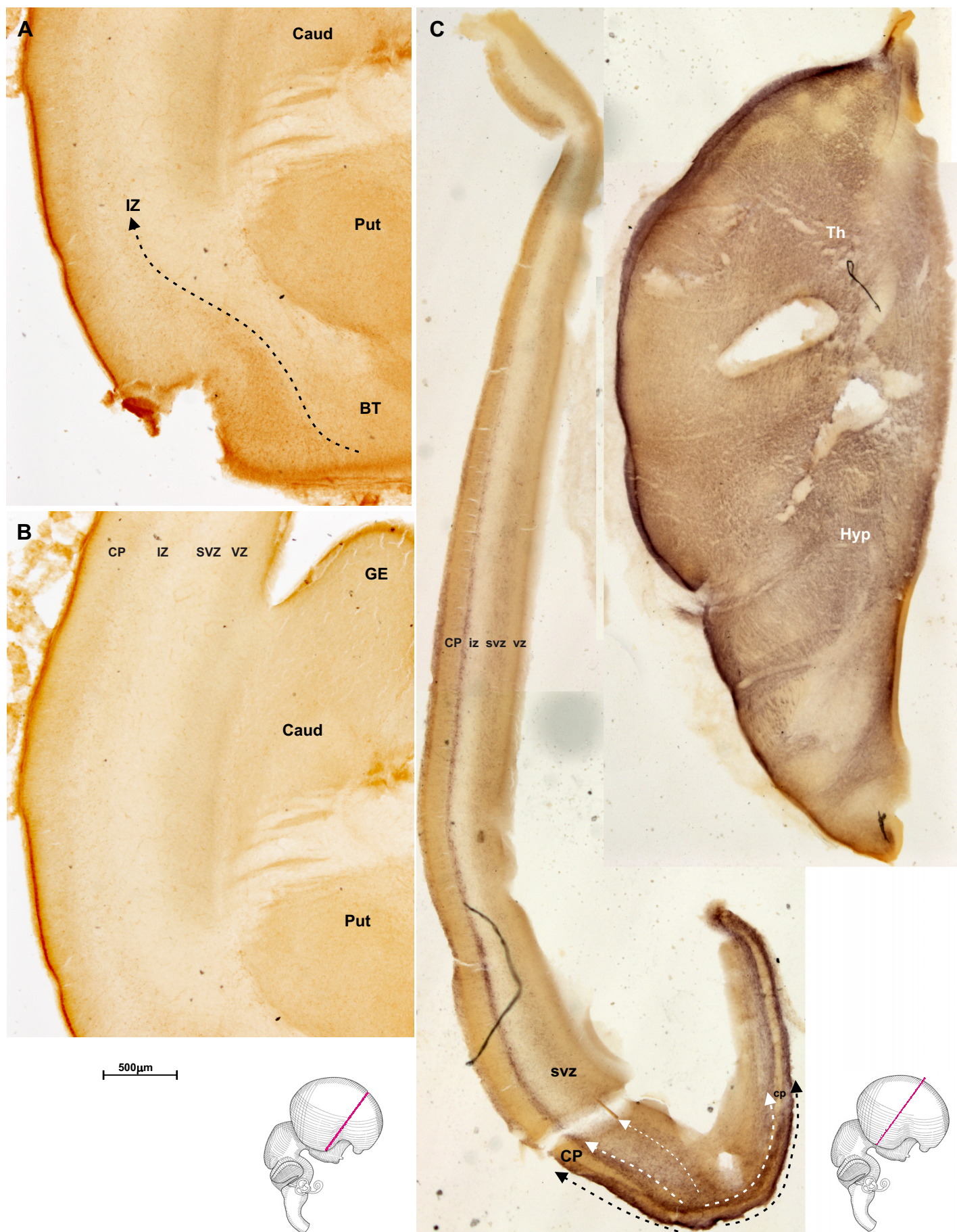
Panel C prikazuje koronalni presjek kroz stražnji dio talamusa i hipotalamusa. Najveći intenzitet GAD67 reaktivnosti vidljiv je u najventralnijem dijelu telencefalona i susjednim djelovima medijalnog i lateralnog telencefaličkog zida. U lateralnoj stijenci telencefalona vidljiva su tri migratorna puta (engl. *stream*) GAD67 reaktivnih stanica. Gusto poredane stanice tvore tanak sloj u marginalnoj zoni, a ispod kortikalne ploče nalazi se deblji sloj gusto poredanih i intenzivno reaktivnih GAD67 stanica. Kroz cijelu širinu subventrikularne zone prisutne su rjeđe poredane GAD67 reaktivne stanice. Gustoća i intenzitet bojenja kroz lateralni telencefalički zid pokazuje gradijent smanjivanja od ventralno prema dorzalno. U





**Slika 5.69** Majmun E52, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD65.





**Slika 5.70** Majmun E52, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD67.

talamusu je vidljiva difuzna GAD67 reaktivnost neuropila, dok u hipotalamusu postoje i veća područja bez reaktivnosti. Uz cjelokupan lateralni rub diencefalona proteže se zona intenzivne GAD67 reaktivnosti.

**Slika 5.71** Majmun E52, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD67. Paneli A-D prikazuju uvećane dijelove presjeka prikazanog na slici 5.70C, a točne pozicije prikaza označene su pravokutnicima na umanjenom presjeku reza.

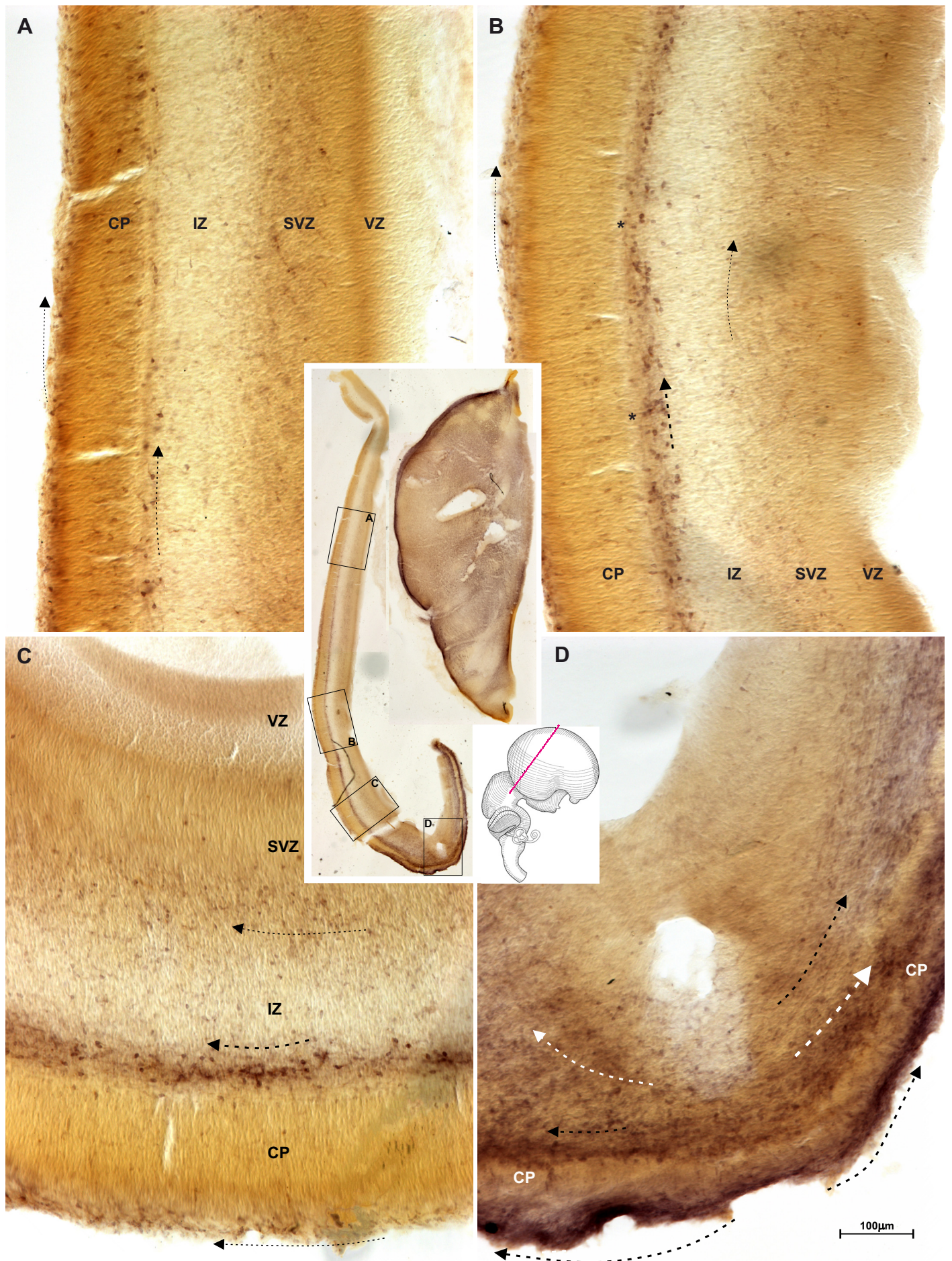
U ventralnom dijelu lateralne stijenke telencefalona (C) vidljiva je trilaminarna distribucija GAD67 reaktivnih malih horizontalno orijentiranih stanica s jednim manjim nastavkom. Gusto poredane stanice tvore tanak sloj u marginalnoj zoni, deblji sloj ispod kortikalne ploče te rjeđi sloj stanica cijelom širinom subventrikularne zone. Iako je u subventrikularnoj zoni vidljiva najmanja gustoća stanica, kroz nju migrira najveći broj stanica slabijeg intenziteta nego u ostala dva sloja. Ispod kortikalne ploče vidljive su najgušće poredane, izrazito reaktivne GAD67 stanice. Kroz cijelu marginalnu zonu GAD67 reaktivne stanice su pravilno poredane i imaju drukčiju laminarnu distribuciju od GAD65 stanica koje su smještene u graničnom području s kortikalnom pločom. Srednje do intenzivno reaktivne radijalno orijentirane stanice mogu se zapaziti i u kortikalnoj ploči. U intermedijalnoj zoni se sporadično vide slabo reaktivne GAD67 pozitivne stanice radijalne orijentacije, što ukazuje na migraciju od subventrikularne zone prema kortikalnoj ploči.

U sredini lateralne stijenke telencefalona (B) u odnosu na ventralniji dio, stanjuje se debljina GAD67 reaktivnog sloja ispod kortikalne ploče, ali reaktivnost stanica u ovoj zoni nije se promijenila. U marginalnoj i subventrikularnoj zoni gustoća GAD67 reaktivnih stanica nije se promijenila, ali se smanjila njihova reaktivnost. Reaktivne stanice se samo sporadično mogu zapaziti u intermedijalnoj zoni. U kortikalnoj ploči reaktivne stanice se nalaze u donjem dijelu i oblikuju diskontinuirani podsloj. Zanimljivo je da se GAD67 reaktivne stanice ne nalaze odmah neposredno ispod kortikalne ploče, već ispod svijetlog sloja koji se nalazi ispod same ploče (zvjezdica).

U dorzalnem dijelu lateralne stijenke telencefalona (A) izrazito se smanjila gustoća stanica u marginalnoj zoni i sloju ispod kortikalne ploče. Zanimljivo je kako se u sloju ispod kortikalne ploče, kao i na granici marginalne zone i kortikalne ploče, mogu zapaziti relativno pravilno distribuirane intenzivno reaktivne stanice. U subventrikularnoj zoni vrlo je mali broj intenzivno reaktivnih GAD67 stanica. Stanice u intermedijalnoj zoni su na ovoj razini izrazito rijetke. U kortikalnoj ploči, većinom u dubljim dijelovima, mogu se zapaziti GAD67 pozitivne stanice.

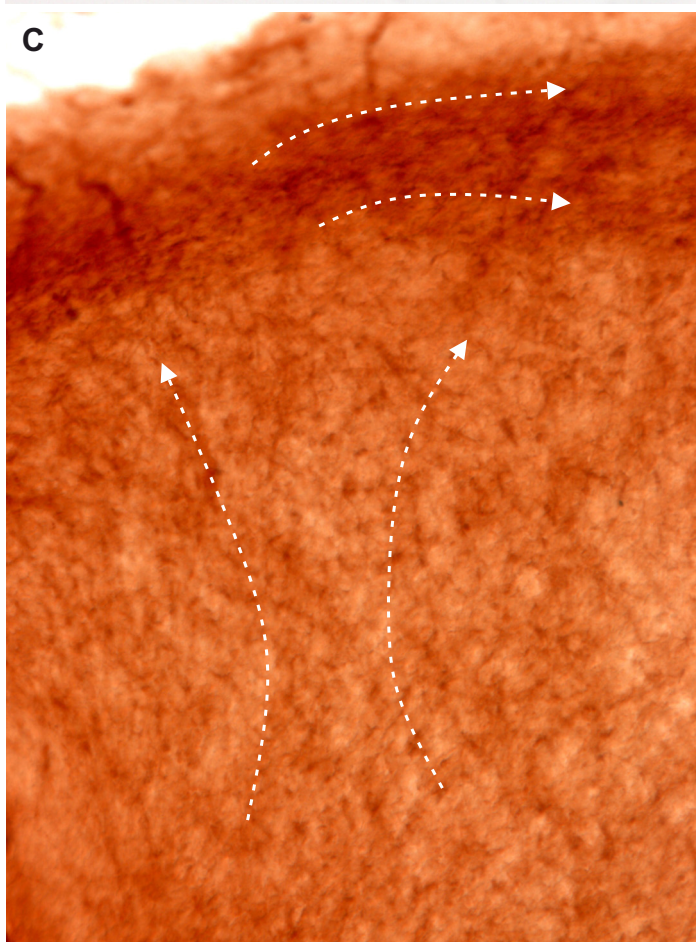
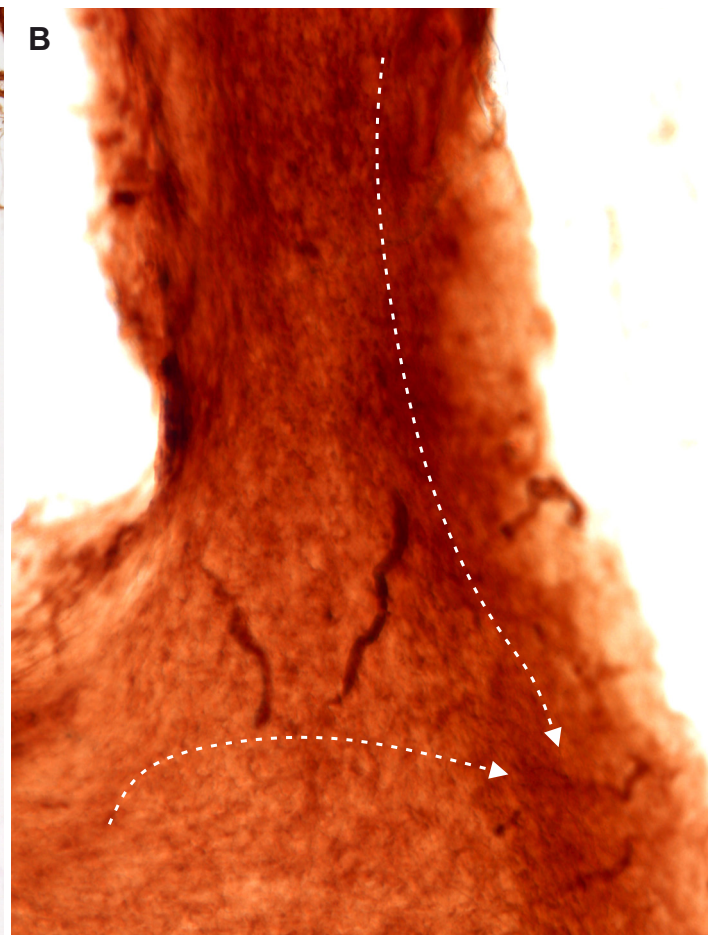
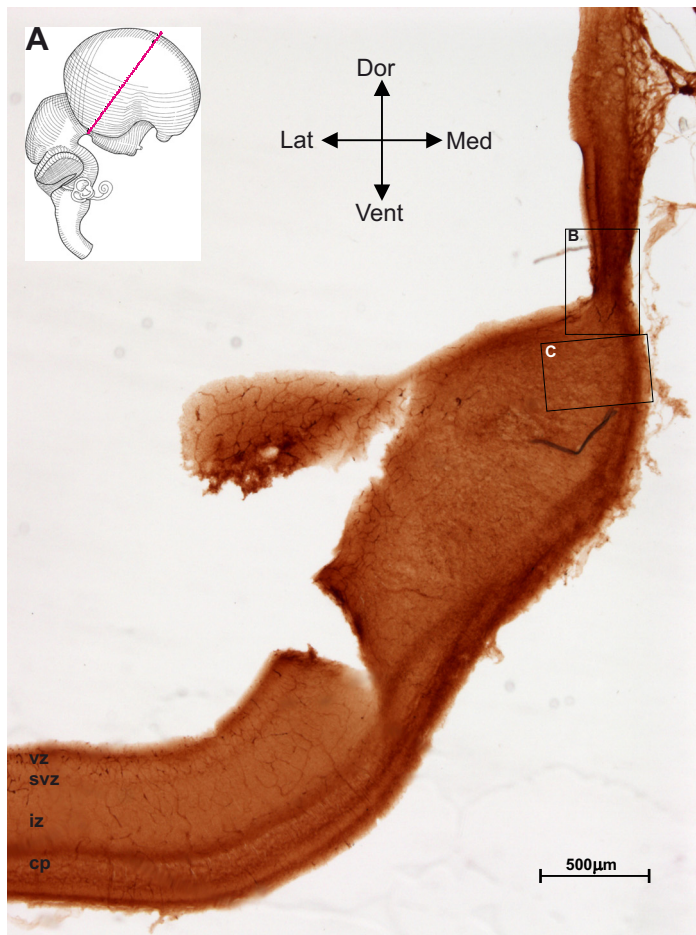
U najventralnijem dijelu telencefalona stanice koje migriraju kroz subventrikularnu zonu i stanice koje čine migratorni sloj ispod kortikalne ploče čine jedinstveni sloj (D).





**Slika 5.71** Majmun E52, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD67. Paneli A-D prikazuju uvećane dijelove presjeka prikazanog na slici 5.70C, a točne pozicije prikaza označene su pravokutnicima na umanjenom presjeku reza.





**Slika 5.72** Majmun E52, rezovi obrađeni imunohistokemijski na somatostatin. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli B i C.

**Slika 5.72** Majmun E52, rezovi obrađeni imunohistokemijski na somatostatin. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli B i C.

Panel A prikazuje koronalni presjek u kaudalnoj razini telencefalona kroz budući parijetalni i temporalni režanj. U ventralnom dijelu medijalnog telencefaličkog zida, prije samog stanjenja stijenke, vidi se područje gusto poredanih somatostatinskih stanica. U istom području nalaze se i brojne intenzivno Mash1 pozitivne stanice (slika 5.54). Na prijelazu stanjenog dijela medijalnog zida prema ventralno (B) zbog jakog pozadinskog bojenja nije moguće jasno razaznati gustu mrežu stanica koja se proteže ventralno ispod pije i nastavlja u marginalnu zonu. Moguće je i da ova reaktivnost odgovara neuropilu. Međutim, u dijelu neposredno ispod (C) nalazi se masa stanica koje se nakupljaju u marginalnoj zoni i usmjeravaju se prema neopalijumu.

### **5.2.1.3 Ekspresija kalcij vežućih proteina u proliferativnim zonama i putevima tangencijalne migracije**

Rezovi majmuskog mozga u stadiju E56 obrađeni su imunohistokemijskim metodama za otkrivanje biljega kalcij vežućih proteina: kalbindina, kalretinina i parvalbumina. Ova tri kalcij vežuća proteina se u odraslom mozgu nalaze u tri glavne subpopulacije kortikalnih GABA-ergičkih neurona s izrazito malim preklapanjem ekspresije između subpopulacija. U subkortikalnim i diencefaličkim strukturama, a moguće i u hipokampusu, kalretinin i kalbindin su dominantno eksprimirani u glutamatergičkim neuronima. U odraslom neokorteksu blaga kalbindinska reaktivnost prisutna je i u dijelu piramidnih neurona, ali je takvu reaktivnost lako razgraničiti od visoke ekspresije u interneuronima. Isto tako, u pojedinim patološkim stanjima i tijekom razvoja uočena je prolazna ekspresija kalbindina u neuronima koji ne sintetiziraju GABA-u. Tijekom ranih stadija pojedine populacije tangencijalno migrirajućih neurona palijuma za koje nije do sada dokazan GABA-ergički fenotip pokazuju visok stupanj ekspresije kalretinina i kalbindina. Parvalbumin, koji u palijalnim i subpalijalnim strukturama gotovo isključivo kolokalizira s GABA-ergičkim neuronima, počinje se eksprimirati relativno kasno te se u telencefalonu prvi parvalbumin reaktivni neuroni mogu sporadično zapaziti tek u ovom stadiju i to samo u području septuma i bazalnog telencefalona (slika 5.78C i 5.78D).

Zbog toga opisi ekspresije kalcij vežućih proteina u embrionalnom i ranom fetalnom razdoblju ne mogu dati jasnu sliku o intenzitetu produkcije različitih subpopulacija GABA-ergičkih neurona. I u ovom stadiju mogu se uočiti kalbindin i kalretinin reaktivne unipolarne stanice koje napuštaju ganglijski brežuljak i prema lateralno se usmjeravaju u palijum, ali je gustoća kalbindinskih stanica daleko manja nego u prethodnom stadiju i one se izvan proliferativnih zona vide samo sporadično. U ganglijskom brežuljku nema kalbindin pozitivnih stanica, ali zato ima dosta kalretininskih. Kalretininska i kalbindinska reaktivnost dominiraju u septalnom dijelu, medijalnom telencefaličkom zidu, marginalnoj zoni i bazalnom telencefalonu, a visok intenzitet prisutan je i u dorzalnom dijelu talamusa (slika 5.73).

Brojne gusto poredane kalbindin reaktivne stanice prisutne su u temporalnom režnju rostralno od proliferativnih zona oko vrha donjeg roga lateralne moždane komore, gdje završava i kaudalni dio ganglijskog brežuljka (slika 5.73B). Stanice se od ovog mjesta rasipaju ventralno prema bazalnom telencefalonu gdje se nastavljaju u marginalnu zonu, dok se dorzalno nastavlja gusti snop stanica između putamena i globus paliduma koje se protežu prema intermedijalnoj zoni dorznog palijuma, a dio stanica usmjeren je prema amigdalama od kuda se vidi kontinuitet preko optičkog živca u hipotalamus. Ovo ukazuje da su proliferativne zone vrha temporalnog režnja važan izvor kalbindinskih neurona koji tangencijalno migriraju u dorzalni palijum, zatim u bazalni telencefalon nakon čega preko



marginalne zone migriraju u neopalijum te kalbindinskih neurona amigdaloidne jezgre i lateralnog hipotalamusa.

Gusto poredane intenzivno reaktivne kalbindinske stanice smještene su u tankoj zoni između kapsule interne i ganglijskog brežuljka (slika 5.73B i 5.73C), a ovaj snop se nastavlja prema proliferativnoj zoni medijalnog telencefaličkog zida koja se naslanja na talamus (slika 5.74). Ovdje se najvjerojatnije radi o migratornim stanicama koje oblikuju tzv. ganglio-talamičko tijelo opisano kod fetusa čovjeka, tj. stanice koje migriraju iz ganglijskog brežuljka u talamus. Međutim, izostanak kalbindinske reaktivnosti u ganglijskom brežuljku i intenzivna reaktivnost u proliferativnim zonama medijalnog telencefaličkoga zida više sugeriraju da se radi o migraciji iz medijalnog zida uz urastajuća vlakna kapsule interne prema dorzalnog palijumu (slika 5.74C). Moguće je da se u ovoj zoni stvaraju i stanice koje migriraju u dorzalni dio talamusa, posebno zato jer su dorzo-lateralni dijelovi talamusa intenzivno reaktivni. Moguće je da su ovi talamički neuroni izvor reaktivnih vlakana koja idu kroz kapsulu internu prema telencefalonu i protežu se kroz donji dio intermedijalne i gornji dio subventrikularne zone (slika 5.75A). No, treba spomenuti kako većina ovih vlakana ima kontinuitet s hipotalamusom iako je u njemu manje kalbindinske reaktivnosti nego u talamusu. Uz to, u frontalnim dijelovima gornji, kondenzirani dio kortikalne ploče pokazuje slabiju kalbindinsku reaktivnost sa obrisima stanica što ne isključuje mogućnost da je reaktivnost vlakana vezana uz izrastanje projekcijskih aksona korteksa.

Guste nakupine malih zrnatih stanica vide se i u dijelu medijalnog telencefaličkog zida koji ide od dorzalnog hipokampusa do talamusa te unutar kojega je nastao koroidni splet (slika 5.74B). Ovo ukazuje da je medijalni telencefalički zid mjesto stvaranja stanica koje odlaze i prema dorzalno u hipokampus (slika 5.74D i 5.75). Intenzivna reaktivnost gusto poredanih stanica vidljiva je u medijalnom zidu rostralno (slika 5.76) i kaudalno (slika 5.77) od stanjenog dijela unutar kojega izrastaju aksoni i nastaje koroidni splet. U stanicama rostralnog dijela hipokampalne ploče koji su nakupljeni u otočiće prisutna je intenzivna reaktivnost. Najlateralnije smješteni otočići sadrže najveće i najdiferencijiranije stanice piramidalnog oblika, dok se u najmedijalnijem dijelu otočići tek formiraju. Kako je izrazito gusta nakupina intenzivno reaktivnih kalbindinskih stanica prisutna u septumu i proliferativnoj zoni prema koroidnom spletu, može se zaključiti da stanice rane hipokampalne ploče imaju porijeklo u fokalnim dijelovima proliferativnih zona medijalnog telencefaličkog zida. Od tuda tangencijalno migriraju prema osnovi hipokampusa gdje se novopridošle stanice priključuju s medijalne strane ranije stvorenim kalbindin pozitivnim stanicama hipokampalne ploče.

Na kaudalnim dijelovima telencefalona na prijelazu hipokampusa prema forniksi u ventrikularnoj zoni i neposredno iznad vide se intenzivno reaktivne, dobro diferencirane te najvećim dijelom radialno orijentirane stanice koje imaju sličan obrazac bojenja i morfologiju kao i stanice ispod hipokampalne ploče u budućem stratum oriensu (slika 5.78A i 5.78B). U

hipokampalnoj fisuri nagomilavaju se kalbindin pozitivne stanice te se usmjeravaju u marginalnu zonu palijuma. Ove stanice imaju morfologiju ranih Cajal-Retziusovih stanica koje su smještene subpikalno, uglavnom horizontalno orijentirane, relativno velikih tijela i često debelog i dugačkog dendrita (slika 5.77D).

Kalretinin (slika 5.73A i 5.79) ima sličan obrazac distribucije i reaktivnosti kao i kalbindin te se nalazi u svim dijelovima u kojima je opisana i kalbindinska reaktivnost, izuzev reaktivnosti u hipokampalnoj i kortikalnoj ploči. Na mjestu spajanja dorzalnog i ventralnog hipokampus (slika 5.80C i slika 5.80D), kalretinin pozitivne stanice nakupljaju se u području iznad same ventrikularne zone i gusto su zbijene sve do područja hipokampalne ploče. Na mjestu gdje hipokampalna ploča nije spojena, masa stanica se usmjerava prema marginalnoj zoni. Ove stanice su znatno gušće postavljene nego stanice reaktivne na kalbindin te su za razliku od kalbindina usmjerene samo u marginalnu zonu palijuma, iako u njoj nema puno malih reaktivnih kalretininskih stanica već dominiraju rane Cajal-Retziusove (slika 5.80C i 5.80D).

Ono što značajno razlikuje kalretininsko bojenje od kalbindinskog je masa unipolarnih migratornih stanica prisutna kroz sve slojeve palijuma (slika 5.81). Posebno gusto stanice su raspoređene kroz intermedijalnu zonu i subventrikularnu zonu. Čak se i u gornjem dijelu ventrikularne zone mogu uočiti brojne migratorne stanice, ali stanice proliferativne morfologije nisu reaktivne. Najmanje stanica nalazi se u kondenziranom, gornjem dijelu kortikalne ploče. Kvalitativno gledajući, gustoća kalretininskih stanica ne čini se značajno manja od gustoće GAD reaktivnih stanica, tako da je dojam kako većinu GAD migrirajućih stanica čine kalretininske stanice.

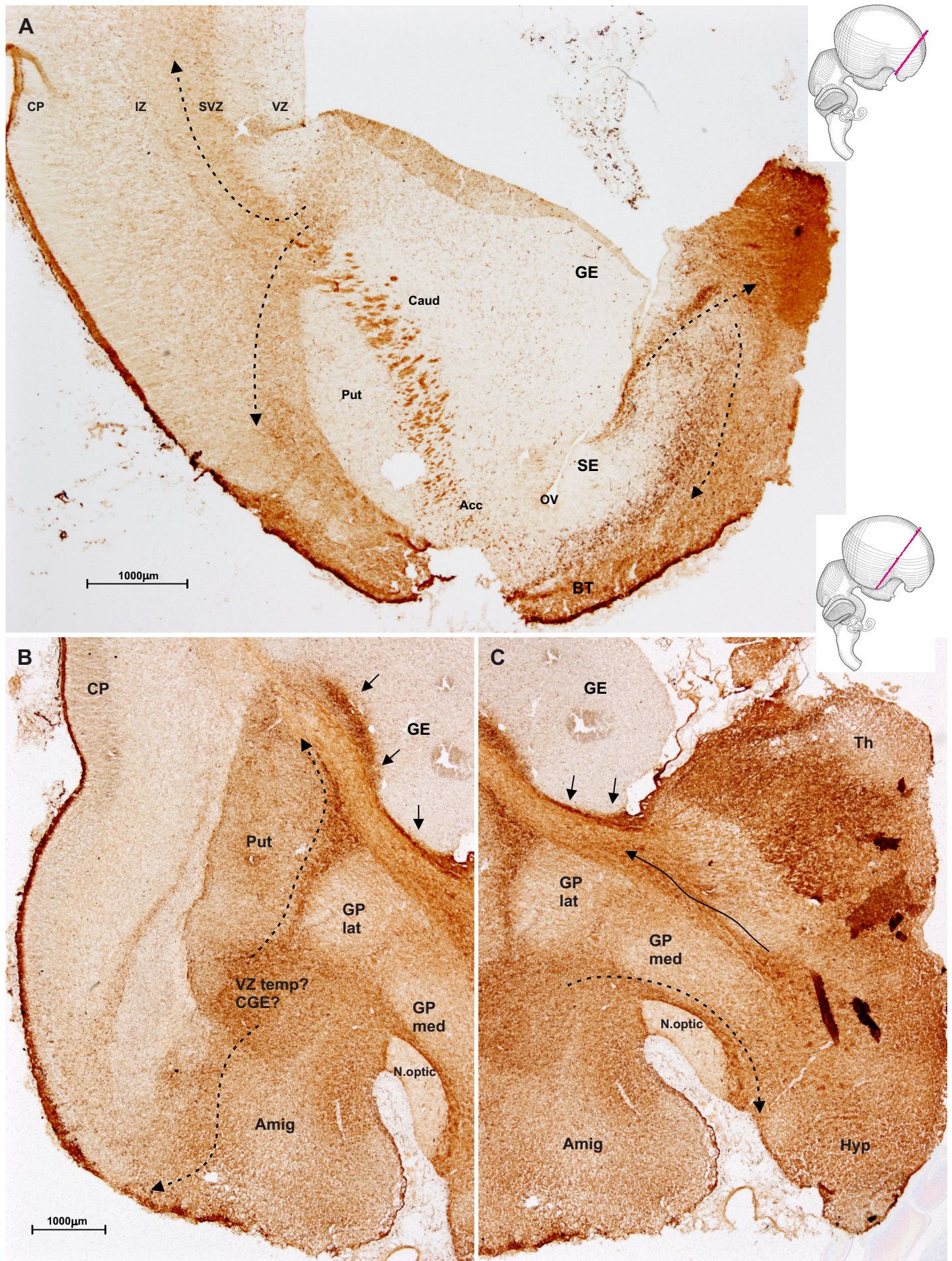
## Deskriptivna analiza kalbindinskih, kalretininskih i parvalbuminskih rezova

**Slika 5.73** Majmun E56, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalretinin (A) i kalbindin (B, C).

Na panelu A koji odgovara koronalnom presjeku kroz septalno područje i paleokortikalni ventrikul, vidljivo je da se najgušća i najintenzivnija reaktivnost kalretinina nalazi u septalnom dijelu subkalozalno i odgovara gusto zbijenim kalretininskim stanicama (slika 5.79B). U septalnom dijelu vide se i nakupine intenzivno reaktivnih stanica, jedna smještena dublje koja se proteže od ventrikularne zone septuma prema dorzalno te druga koja se proteže sredinom septuma od dorzalno prema bazalnom telencefalonu (isprekidane strelice, A). Stanice u ovim područjima imaju unipolarnu morfologiju, što ukazuje da se radi o migratornim stanicama (slika 5.79A). Međutim, nije isključeno da se radi o neuronima medijalne i lateralne septalne jezgre, iako je vjerojatnije da se radi o migratornim stanicama koje se nalaze oko lateralne septalne jezgre, a da stanice septalnih jezgara nisu pozitivne. Veći broj, ne previše gusto distribuiranih stanica prisutan je kroz cijeli ganglijski brežuljak, a gustoća se značajno povećava u lateralnom dijelu. U tom dijelu odvajaju se dva gusto formirana snopa stanica, jedan koji kroz gornji dio subventrikularne i intermedijalnu zonu ide prema dorzalnom telencefalonu i drugi koji oko putamena ide u bazalni telencefalon (isprekidane strelice, A). U strijatumu nema guste kalretininske reaktivnosti, iako je GAD65 reaktivnost izrazito visoka (slika 5.64A), dok bazalni telencefalon ima visoku gustoću kalretininskih stanica (slika 5.79C). Intenzivna reaktivnost nastavlja se i u marginalnu zonu gdje su stanice smještene površno, a vlakna se nalaze u središnjem dijelu. Diskretna kalretininska reaktivnost vlakana vidljiva je u intermedijalnoj zoni te je u kontinuitetu s reaktivnošću kapsule interne.

Panel B prikazuje koronalni presjek kroz talamički držak i prolazi sredinom talamusa te zahvaća i hipotalamus. Kalbindinska reaktivnost vidljiva je u ventralnom dijelu telencefalona na spoju prema talamusu koji je prikazan na panelu C, kao i cijeli diencefalon. U diencefalonu reaktivnost je posebno jaka u dorzo-lateralnim dijelovima talamusa. U hipotalamusu je reaktivnost kalbindina nešto slabija, no od hipotalamusa postoji kontinuitet vlakana koja idu kroz kapsulu internu prema telencefalonu (strelica, C). Između kapsule interne i ganglijskog brežuljka, u kojem nema kalbindinske reaktivnosti, nalazi se tanka zona posebno intenzivne kalbindinske reaktivnosti koja se nastavlja od tanke proliferativne zone medijalnog telencefaličkog zida (male strelice, B i C). Ovdje se najvjerojatnije radi o migratornim stanicama. Brojne gusto poredane kalbindin reaktivne stanice prisutne su u temporalnom režnju rostralno od proliferativnih zona oko vrha donjeg roga lateralne moždane komore, gdje završava i kaudalni dio ganglijskog brežuljka (B). Stanice se od ovog mjesta usmjeravaju u tri smjera: ventralno prema bazalnom telencefalonu odakle se





**Slika 5.73** Majmun E56, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalretinin (A) i kalbindin (B, C).



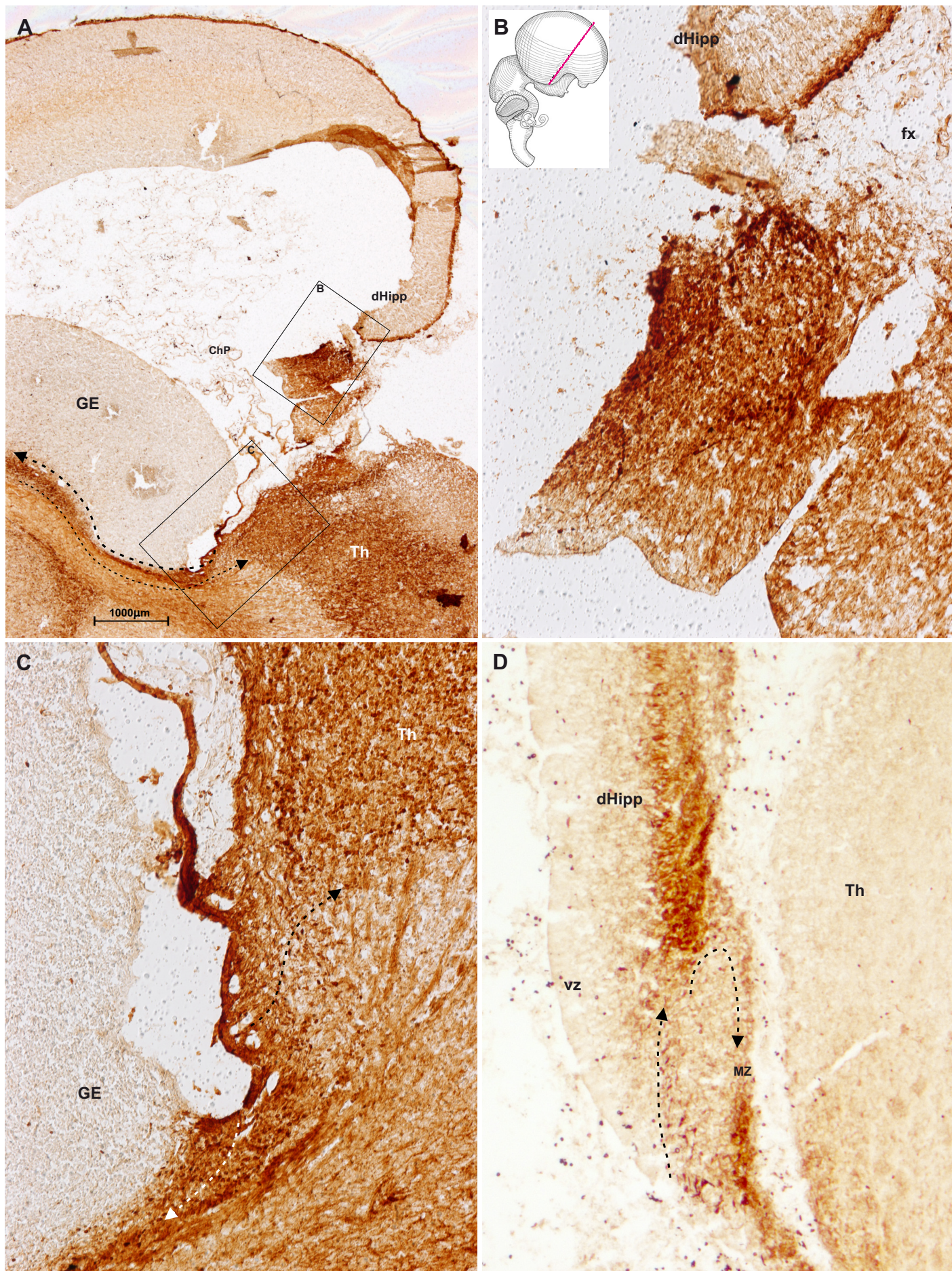
nastavljaju u marginalnu zonu; dorzalno između putamena i globus paliduma te prema intermedijalnoj zoni dorzalnog palijuma (isprekidane strelice, B); dio stanica usmjeren je prema amigdalama od kuda se vidi kontinuitet preko optičkog živca u hipotalamus (isprekidane strelice, C). Ovo ukazuje da su proliferativne zone vrha temporalnog režnja važan izvor kalbindinskih stanica koje tangencijalno migriraju u dorzalni palijum, ali i u bazalni telencefalon te kroz marginalnu zonu dalje u neopalijum, kao i važan izvor kalbindinskih neurona amigdaloidne jezgre i lateralnog hipotalamusa. Intenzivna reaktivnost se, kao i na kalretininskim preparatima, iz bazalnog telencefalona nastavlja u marginalnu zonu gdje su stanice smještene površno, a vlakna se nalaze u središnjem dijelu.

Brojne gusto poredane kalbindin reaktivne stanice prisutne su u temporalnom režnju rostralno od proliferativnih zona oko vrha donjeg roga lateralne moždane komore, gdje završava i kaudalni dio ganglijskog brežuljka (B). Stanice se od ovog mjesta usmjeravaju u tri smjera: ventralno prema bazalnom telencefalonu odakle se nastavljaju u marginalnu zonu; dorzalno između putamena i globus paliduma te prema intermedijalnoj zoni dorzalnog palijuma; dio stanica usmjeren je prema amigdalama od kuda se vidi kontinuitet preko optičkog živca u hipotalamus. Ovo ukazuje da su proliferativne zone vrha temporalnog režnja važan izvor kalbindinskih stanica koje tangencijalno migriraju u dorzalni palijum, ali i u bazalni telencefalon te kroz marginalnu zonu dalje u neopalijum, kao i važan izvor kalbindinskih neurona amigdaloidne jezgre i lateralnog hipotalamusa.

**Slika 5.74** Majmun E56, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalbindin. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli B i C.

Panel A prikazuje dorzalni dio koronalnog presjeka sa slike 5.73B. Guste nakupine malih zrnatih stanica vide se i u dijelu medijalnog telencefaličkog zida koji ide od dorzalnog hipokampusa do talamusa te unutar kojeg je nastao koroidni splet (B). Na postojećim rezovima nije se mogao uočiti kontinuitet ovih stanica kroz medijalni telencefalički zid, ali je uočena nakupina stanica koja iz tankog dijela medijalnog telencefaličkog zida ulazi prema dorzalnog dijelu talamusa (crna isprekidana strelica, C). Ovo ukazuje da je medijalni telencefalički zid mjesto stvaranja stanica koje odlaze prema dorzalno u hipokampus i prema ventralno u dorzalni talamus koji izražava visok stupanj kalbindinske reaktivnosti. Tanka proliferativna zona medijalnog telencefaličkog zida koja se proteže do ganglijskog brežuljka pokazuje kalbindinsku reaktivnost i okružena je gusto poredanim intenzivno reaktivnim stanicama (bijela isprekidana strelica, C). Ove stanice čine nakupinu na ganglio-talamičkoj granici te odgovaraju strukturi koja bi mogla biti ganglio-talamičko tijelo (isprekidane strelice, A; slika 5.59 Nissl). No, bojenje proliferativne zone medijalnog zida i gomilanje reaktivnih stanica oko nje više ukazuje kako je to mjesto stvaranja kalbindin reaktivnih stanica koje odlaze prema talamusu i telencefalonu, što je suprotan smjer migracije od smjera opisanog





**Slika 5.74** Majmun E56, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalbindin. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli B i C.



za ganglio-talamičko tijelo. Stoga, nije isključeno da su ove stanice zapravo migratorne stanicama koje iz ganglijskog brežuljka idu u talamus (isprekidana strelica, A). U ganglijskom brežuljku ne mogu se uočiti kalbindin pozitivne stanice (C).

Na kaudalnijem koronalnom presjeku (D) koji prolazi kroz dorzalni hipokampus, vidljiva je kalbindinska reaktivnost hipokampalne ploče. Reaktivnost malih dijelova proliferativnih zona medijalnog zida i kontinuitet kalbindinske reaktivnosti prema marginalnoj zoni ukazuje na zajedničko porijeklo kalbindinskih stanica arhikorteksa i marginalne zone.

**Slika 5.75** Majmun E56, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalbindin. Pravokutnik označen na panelu A uvećano je prikazan kao panel B.

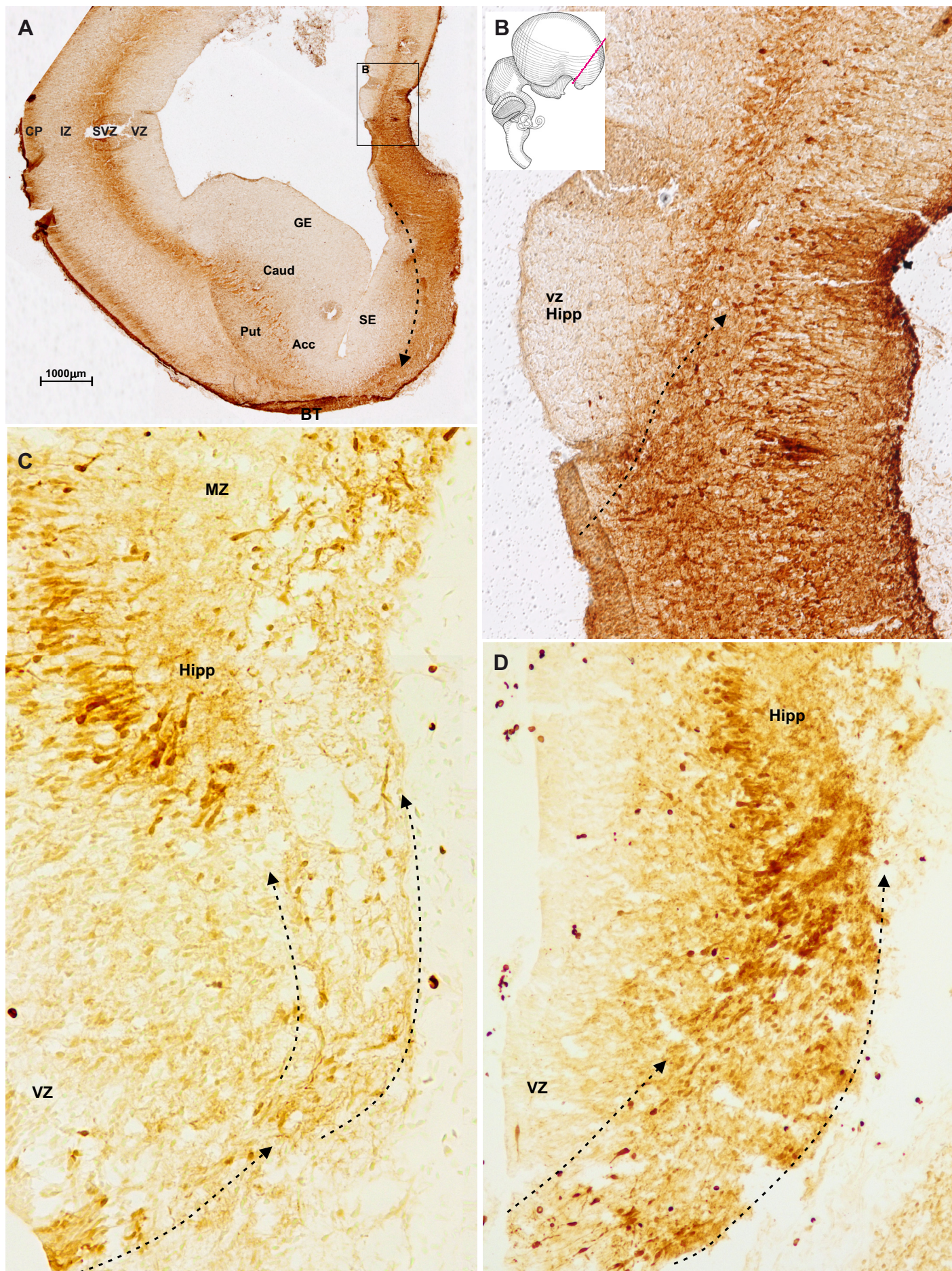
Paneli A i B prikazuju koronalni presjek kroz rostralni dio telencefalona. Vidljiv je kontinuitet kalbindinske reaktivnosti kroz cjelokupan medijalni telencefalički zid, uključujući i središnji dio same ventrikularne zone. Iz ovog dijela stanice se usmjeravaju prema bazalnom telencefalonu (isprekidana strelica, A), ali i subpijalno gdje su intenzivno reaktivne kalbindinske stanice posebno guste. Vidljive su i pojedinačne stanice koje najvjerojatnije odgovaraju najrostralnijem dijelu hipokampalne ploče do koje dolaze iz ventrikularne zone središnjeg dijela medijalnog zida (strelica, B). Moguće je kako se iz ovog područja stanice usmjeravaju dorzalno u intermedijalnu zonu.

Na kaudalnijim presjecima vide se reaktivne, radijalno orijentirane stanice u ograničenim dijelovima proliferativne zone iz koje migratorne stanice odlaze u marginalnu zonu i prema hipokampalnoj ploči (isprekidane strelice, C i D).

**Slika 5.76** Majmun E56, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalbindin. Pravokutnici označeni na panelu B uvećano su prikazani kao paneli C i D.

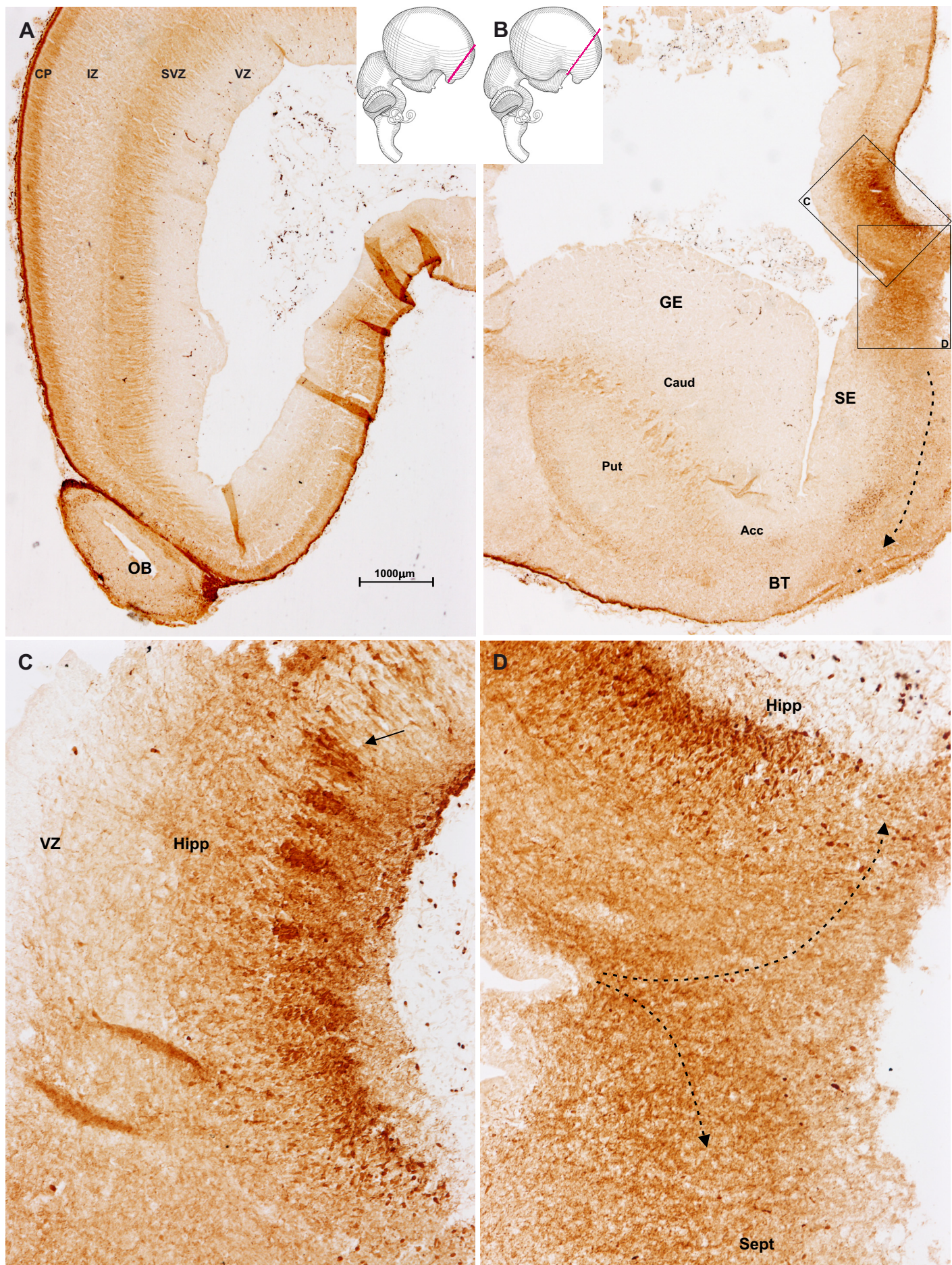
Paneli prikazuju koronalne presjeke kroz rostralni dio telencefalona, panel A prikazuje presjek kroz prednji dio olfaktornog tuberkula, a panel B kroz septum s paleokortikalnim ventrikulom. U frontalnim dijelovima gornji, kondenzirani dio kortikalne ploče pokazuje slabiju kalbindinsku reaktivnost s obrisima stanica, dok na kaudalnijim razinama nema reaktivnosti u stanicama kortikalne ploče. Kroz donji dio intermedijalne i gornji dio subventrikularne zone vidljiva je reaktivnost koja najvjerojatnije odgovara vlaknima iz kapsule interne (slika 5.75A), ali nije moguće u potpunosti isključiti da je ova reaktivnost vezana uz stanice, s obzirom da se vide reaktivni obrisi tijela. Intenzivna reaktivnost gusto poredanih stanica vidljiva je u medijalnom zidu (B) i to u stanicama hipokampalne ploče koje oblikuju otočiće (C) te u dorzalnom dijelu septuma (D). Najlateralnije smješteni otočići sadrže najveće i najdiferenciranije stanice piramidalnog oblika (strelica, C), dok se u najmedijalnijem dijelu otočići tek stvaraju. Nakupina intenzivno reaktivnih kalbindinskih stanica smještena je u dijelu septuma prema forniksi i proliferativnoj zoni koroidnog spleta (D). Ovakav obrazac





**Slika 5.75** Majmun E56, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalbindin. Pravokutnik označen na panelu A uvećano je prikazan kao panel B.





**Slika 5.76** Majmun E56, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalbindin. Pravokutnici označeni na panelu B uvećano su prikazani kao paneli C i D.



reaktivnosti ukazuje na porijeklo stanica rane hipokampalne ploče iz fokalnih dijelova proliferativnih zona medijalnog telencefaličkog zida i tangencijalnu migraciju prema osnovi hipokampusa gdje se novostvorene stanice pridružuju s medijalne strane ranije stvorenim kalbindin pozitivnim stanicama hipokampalne ploče.

**Slika 5.77** Majmun E56, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalbindin (A-C) i rez obrađen imunohistokemijski na kalbindin te dodatno obojen Nissl metodom (D). Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao panel B i C.

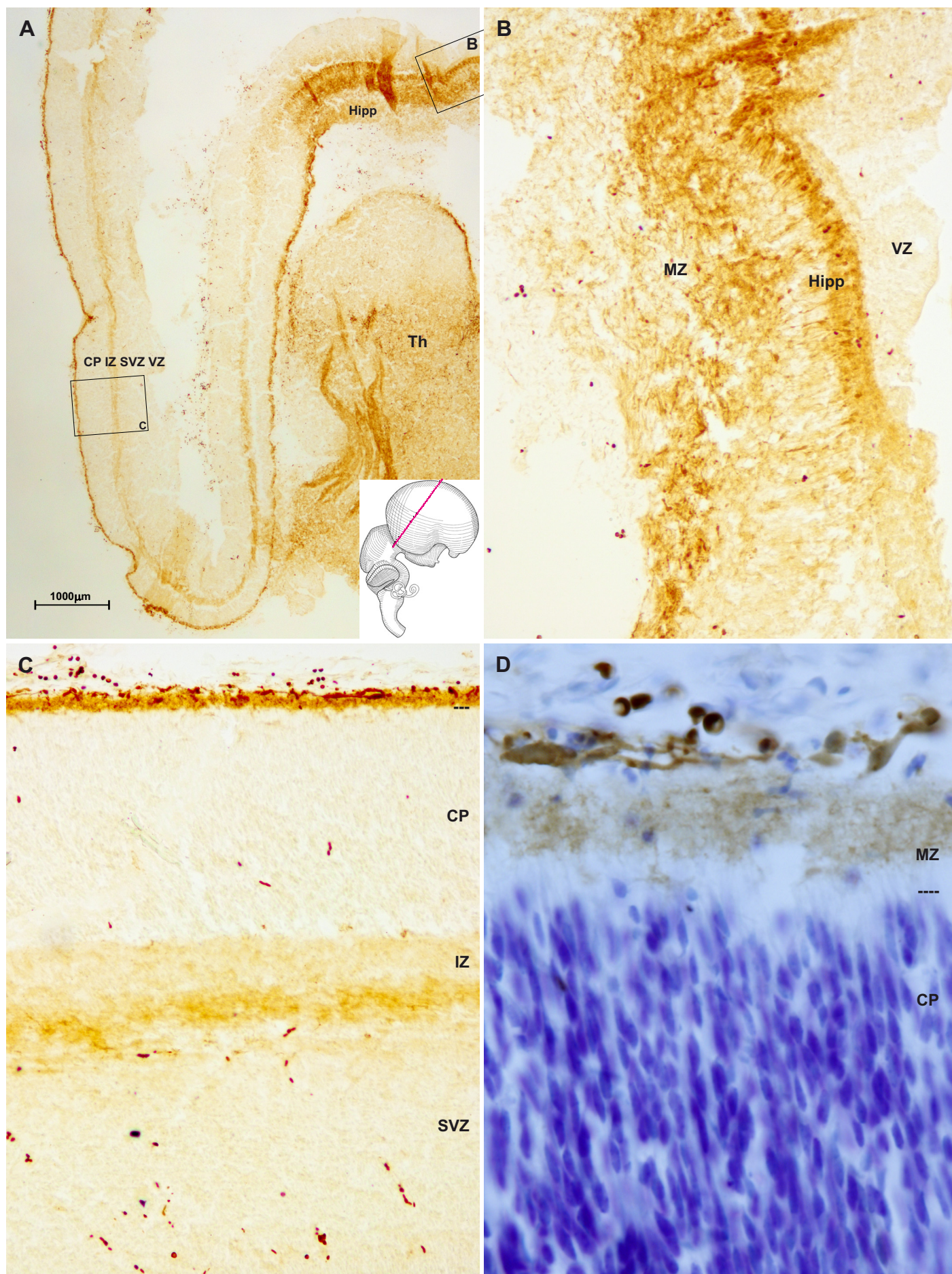
Na koronalnom presjeku kroz kaudalni dio telencefalona, na mjestu spajanja dorazalnog i ventralnog hipokampusa (A), vidi se intenzivna kalbindinska reaktivnost unutar medijalnog zida. Reaktivnost je vidljiva u dva sloja (B): neposredno iznad ventrikularne zone gusto su zbijene stanice hipokampalne ploče, a iznad njih su subpijalno smještene unipolarne stanice. U lateralnoj telencefaličkoj stijenci marginalna zona je gotovo u potpunosti reaktivna, a u intermedijalnoj zoni vidljiva je reaktivnost vlakana (C).

U subpijalnom dijelu marginalne zone (D) gusto su poredane stanice relativno velikih tijela i debelog, dugačkog dendrita. Stanice su uglavnom horizontalno orijentirane te morfologijom odgovaraju ranim Cajal-Retziusovim stanicama. Ove stanice ne pokazuju intenzivno Nissl bojenje, za razliku od malih, okruglih, uglavnom subpijalno smještenih stanica. Preostali dio marginalne zone ispunjava srednje reaktivna, gusta mreža koju najvjerojatnije čine aksoni. Mreža aksona odvojena je od subpijalnog sloja stanica i od kortikalne ploče.

**Slika 5.78** Majmun E56, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalbindin (A, B) i parvalbumin (C, D). Pravokutnik označen na panelu C uvećano je prikazan kao panel D.

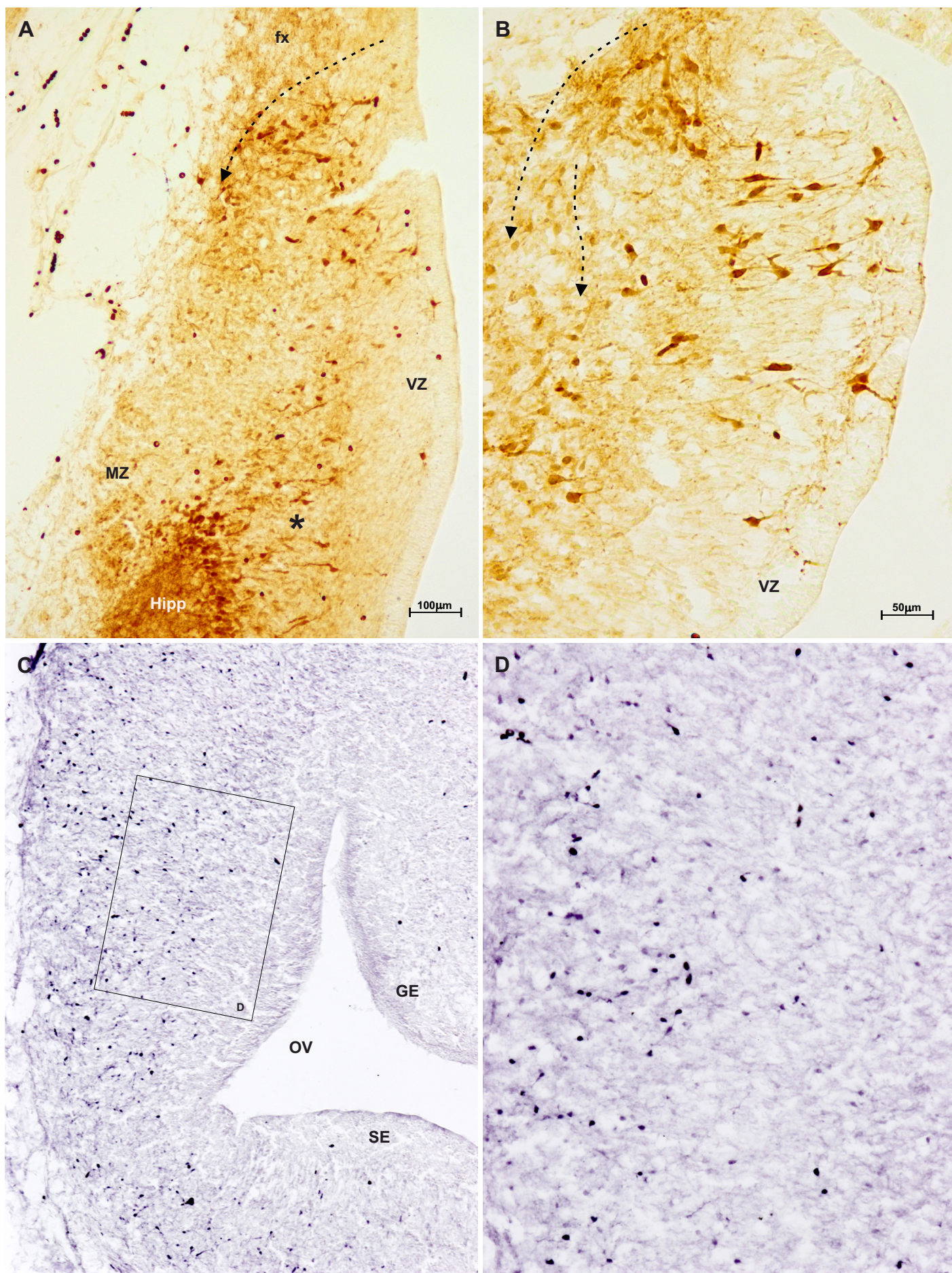
Na prijelazu hipokampusa prema forniksi (A) u ventrikularnoj zoni i neposredno iznad vide se intenzivno reaktivne, dobro diferencirane, najvećim dijelom radijalno orijentirane stanice koje imaju sličan obrazac reaktivnosti i morfologiju kao i stanice ispod hipokampalne ploče (stratum oriens - zvjezdica, A). Kalbindin pozitivne stanice nagomilavaju se u hipokampalnoj pukotini odakle se usmjeravaju u marginalnu zonu i prema kortikalnoj ploči (B).

Parvalbuminska reaktivnost prisutna je u području paleokortikalnog ventrikula (C i D), u pojedinim stanicama koje se mogu ispratiti od ganglijskog brežuljka do bazalnog dijela telencefalona.



**Slika 5.77** Majmun E56, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalbindin (A-C) i rez obrađen imunohistokemijski na kalbindin te dodatno obojen Nissl metodom (D). Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao panel B i C.





**Slika 5.78** Majmun E56, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalbindin (A, B) i parvalbumin (C, D). Pravokutnik označen na panelu C uvećano je prikazan kao panel D.



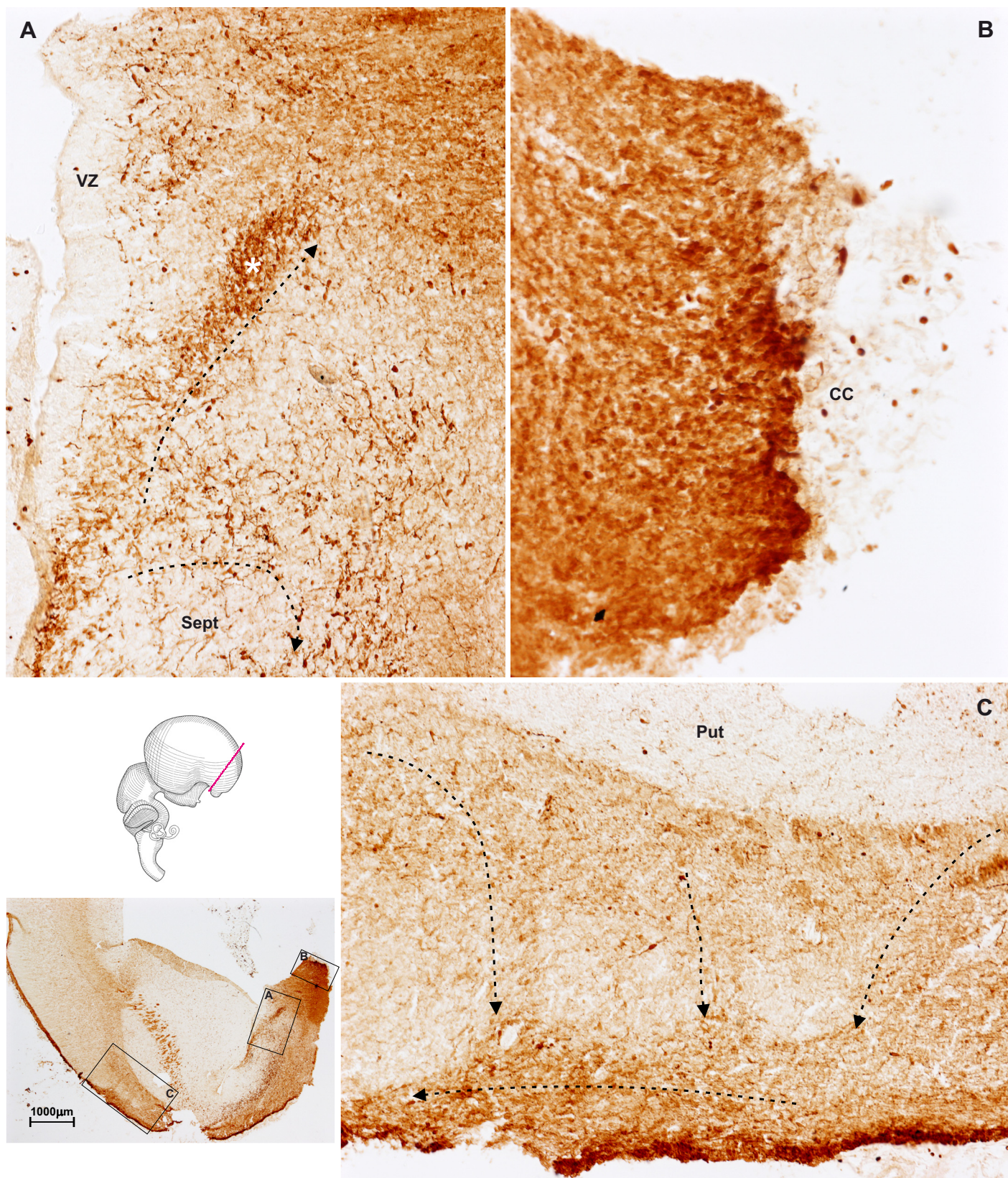
**Slika 5.79** Majmun E56, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalretinin. Paneli A-C prikazuju uvećane dijelove presjeka prikazanog na slici 5.73A, a točne pozicije prikaza označene su pravokutnicima na umanjenom presjeku reza.

Na razini septuma može se ispratiti snop gusto poredanih migratornih stanica koji dolazi iz ventralnog dijela septalne ventrikularne zone i zatim mijenja orijentaciju za 180 stupnjeva i odlazi prema bazalno (A). Jedan dio stanica migrira prema dorzalno i smješta se subkalozalno (zvjezdica, A) te je tamo najgušća i najintenzivnija reaktivnost koja odgovara gusto zbijenim kalretininskim stanicama (B). U bazalnom telencefalonu vidljiva je visoka gustoća kalretininskih stanica (C) koje dolaze od lateralno iz ganglijskog brežuljka ili s medijalne strane iz septalnog područja (C). Stanice se spuštaju prema marginalnoj zoni te se smještaju subpijalno.

**Slika 5.80** Majmun E56, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalretinin. Pravokutnik označen na panelu A uvećano je prikazan kao panel B, a pravokutnik označen na panelu C uvećano je prikazan kao panel D.

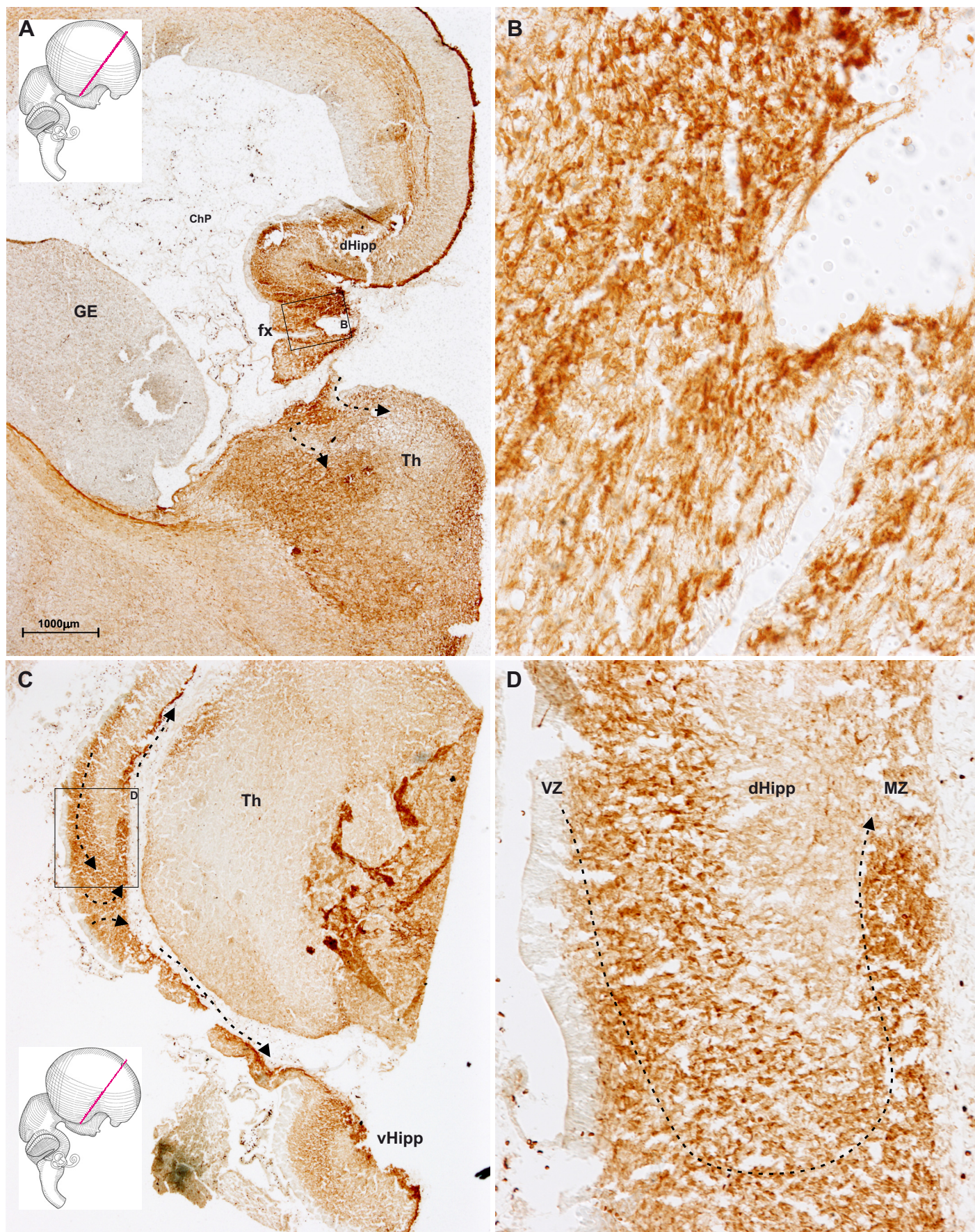
Guste nakupine malih zrnatih stanica vide se u dijelu medijalnog telencefaličkog zida koji ide od dorzalnog hipokampusu do talamusa i unutar kojeg se nalazi koroidni splet (A). Čini se kako je gustoća ovih stanica (B) nešto veća nego na kalbindinskim rezovima (slika 5.74B). Na postojećim rezovima nije se mogao uočiti kontinuitet ovih stanica kroz medijalni telencefalički zid, ali je uočena nakupina stanica koja iz tankog dijela medijalnog telencefaličkog zida (isprekidane strelice, B) ulazi prema dorzalnog dijelu talamusa.

Kaudalnije, na mjestu spajanja dorzalnog i ventralnog hipokampusu (C) kalretinin pozitivne stanice nakupljaju se u području iznad same ventrikularne zone i gusto su zbijene sve do područja hipokampalne ploče (D). Na mjestu gdje hipokampalna ploča nije spojena, masa stanica se usmjerava prema marginalnoj zoni (isprekidana strelica, D).



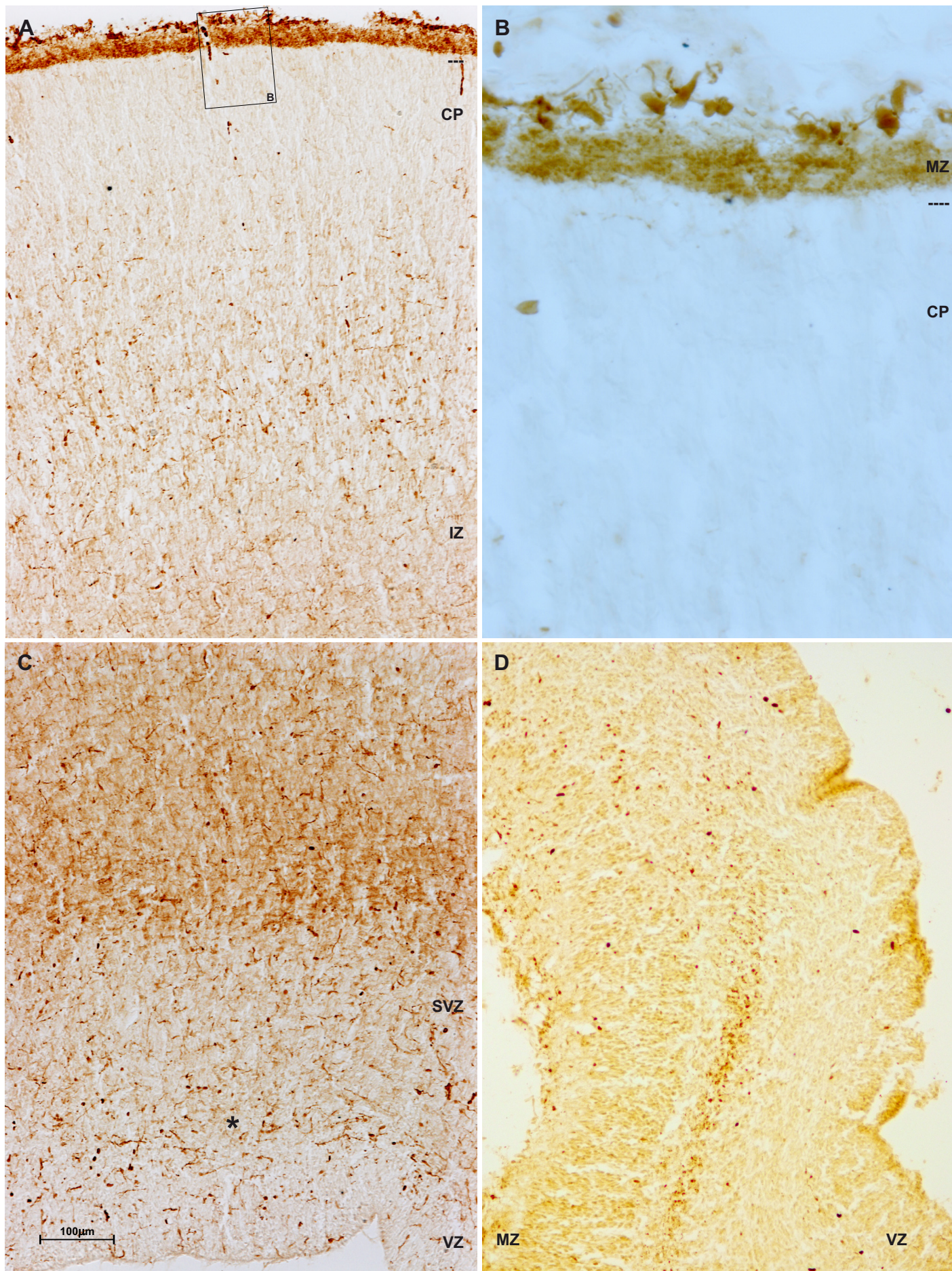
**Slika 5.79** Majmun E56, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalretinin. Paneli A-C prikazuju uvećane dijelove presjeka prikazanog na slici 5.73A, a točne pozicije prikaza označene su pravokutnicima na umanjenom presjeku reza.





**Slika 5.80** Majmun E56, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalretinin. Pravokutnik označen na panelu A uvećano je prikazan kao panel B, a pravokutnik označen na panelu C uvećano je prikazan kao panel D.





**Slika 5.81** Majmun E56, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalretinin (A-C) i GABA (D). Pravokutnik označen na panelu A uvećano je prikazan kao panel B.



**Slika 5.81** Majmun E56, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalretinin (A-C) i GABA (D). Pravokutnik označen na panelu A uvećano je prikazan kao panel B.

Paneli A-C prikazuju dio lateralne telencefaličke stijenke. Ono što značajno razlikuje kalretininsko bojenje od kalbindinskog je masa unipolarnih, kalretininskih, migratornih stanica prisutna kroz sve slojeve palijuma (A). Stanice su posebno gusto raspoređene kroz intermedijalnu i subventrikularnu zonu (C). Čak se i u gornjem dijelu ventrikularne zone (zvjezdica, C) mogu uočiti brojne migratorne stanice, ali proliferativne stanice nisu reaktivne. Najmanje stanica nalazi se u kondenziranom, gornjem dijelu kortikalne ploče (A). Kvalitativno gledajući, gustoća kalretininskih stanica ne čini se značajno manja od gustoće GAD reaktivnih stanica (slika 5.34C), tako da je dojam kako većinu GAD migrirajućih stanica čine kalretininske stanice. Može se zaključiti kako postmitotički prospektivni kalretininski GABA-ergički neuroni vrlo brzo počinju izražavati ovaj kalcij vežući protein. U subpijalnom dijelu marginalne zone (B) gusto su poredane stanice relativno velikih tijela i debelog, dugačkog dendrita. Stanice su uglavnom horizontalno orijentirane i morfologijom odgovaraju ranim Cajal-Retziusovim stanicama. Ovakav obrazac istovjetan je kalbindinskom bojenju (slika 5.78D). Preostali dio marginalne zone ispunjava srednje reaktivna gusta mreža koju najvjerojatnije čine aksoni.

U ovom stadiju se u palijumu mogu sporadično uočiti prve stanice pozitivne na GABA-u (D).

### 5.2.2 Tangencijalna migracije u čovjeka između 11. i 14. tjedna nakon začeća

U odnosu na prethodni stadij, u ovom razdoblju vidljiva je daljnja diferencijacija svih struktura. Na kraju ranog fetalnog razdoblja (fetus čovjeka 11PCW) forniks je dobro razvijen i povezuje septum s hipkampalnim područjem, a vlakna korpus kalozuma polako urastaju u telencefalon (slika 5.82A i 5.82B). Neokortikalni dio telencefaličkog zida pokazuje tipičnu ranu fetalnu laminaciju (slika 5.82C). Neposredno ispod kortikalne ploče je tanak proziran sloj, ispod kojega se u ventralnom dijelu lateralnog zida nalazi podsloj stanica koje se grupiraju u otočiće debljine do 5 redova (slika 5.82D). Ovaj podsloj se prema dorzalno polako razrjeđuje i nestaje, što ukazuje da se radi o stanicama koje migriraju iz ventralnih u dorzalne dijelove telencefalona. Marginalna zona je siromašna stanicama i one su uglavnom smještene subpijalno te su čak manje gustoće nego na početku ranog fetalnog razdoblja. Prema dorzalno ovaj sloj postaje sve rjeđi i sastavljen je samo od jednog reda stanica. To ukazuje na smanjenje migracije kroz marginalnu zonu tijekom ranog fetalnog razdoblja, iako se u kaudalnim dijelovima medijalnog zida (slika 5.83A) subpijalno vide brojne gusto poredane, unipolarne i bipolarne AChE pozitivne stanice koje morfologijom i veličinom odgovaraju ranim Cajal-Retziusovim stanicama (slika 5.83C). Njihova gustoća se smanjuje prema vrhu telencefalona pa ih na ondje više nema (slika 5.83B) što ukazuje kako tijekom ovog razdoblja Cajal-Retziusove stanice dolaze iz arhikortikalnog dijela medijalnog telencefaličkog zida i prema dorzalno migriraju u marginalnu zonu.

Tjedan dana kasnije, na početku srednjeg fetalnog razdoblja (slika 5.84A i 5.85B), strijatum je u potpunosti podijeljen masivnim snopom vlakana kojega čine urastajući talamokortikalni i izrastajući kortikalni aksoni. Tipična fetalna laminacija prisutna je u svim dijelovima telencefalona, a u neokortikalnim dijelovima uključuje marginalnu zonu, kortikalnu ploču, intermedijalnu, subventrikularnu i ventrikularnu zonu, dok se na Golgi preparatima (slika 5.84C) na temelju pozadinskog bojenja i žilnog crteža može kao posebna uočiti zona ispod kortikalne ploče. Na Golgi preparatima se također u dorzalnom dijelu stijenke telencefalona (slika 5.84D) vidi posebno pojačana impregnacija u dijelu koji odgovara subventrikularnoj i intermedijalnoj zoni, u kojoj su gusto poredani tangencijalni nastavci. Moguće je da se radi o zoni tangencijalne migracije, ali i o zoni rasta aksona.

U srednjem fetalnom stadiju dolazi i do oblikovanja vanjske subventrikularne zone (slika 5.85 i 5.86), no ona je samo na nekim mjestima jasno odvojena od unutarnje (slika 5.85D). U ostalim dijelovima telencefalona vanjska subventrikularna zona se u odnosu na ventrikularnu i subventrikularnu prepoznaje kao zona rjeđe raspoređenih stanica, širine koja prelazi širinu ostalih proliferativnih zona zajedno. Moguće je da vanjska subventrikularna zona nije samo novi proliferativni sloj, već je zona brojnih tangencijalno migrirajućih stanica (slika 5.87) koje u lateralnom migratornom snopu napuštaju ganglijski brežuljak (slika 5.85C,



5.85D, 5.86C). U ovom stadiju izrazito masivna postaje i proliferativna zona ispred vrha donjeg roga lateralnih komora (slika 5.86D), koja može odgovarati kaudalnom završetku ganglijskog brežuljka. Kako je ova zona u bliskom dodiru s marginalnom zonom moguće je da se radi o zoni proliferaciji stanica koje tangencijalno migriraju kroz marginalnu zonu.

Važna promjena koja se događa u ovom razdoblju je i stvaranje bilaminarne kortikalne ploče. Iako se već s 13 tjedana može uočiti fina razlika u gustoći gornjeg i donjeg dijela kortikalne ploče (slika 5.85A i 5.85B), ona je još uvijek kompaktna. Tjedan dana kasnije (slika 5.85C i 5.85D) jasno je vidljiva bilaminarna struktura kortikalne ploče, s gornjim dijelom koji je tamnije obojen od donje polovice kortikalne ploče (slika 5.86A).

Struktura proliferativnih zona medijalnog telencefaličkoga zida (slika 5.88., 5.89, 5.90 i 5.91) pokazuje intenzivno stvaranje stanica u ovom dijelu. Stanice koje se stvaraju ispod forniksa i na spoju s koroidnim spletom, ali i iz samog koroidnog spleta, kao i u ranijem fetalnom razdoblju usmjeravaju se prema pijalnoj površini i zatim migriraju kroz marginalnu zonu u neopalijum. Stanice smještene na površini forniksa preko girus dentatusa odlaze u marginalnu zonu. Čini se da stanice koje se u ovom stadiju nakupljaju kod osnove girus dentatusa dolaze iz dva izvora: iz proliferativne zone koja je nastavak proliferativnih zona hipokampusu te iz proliferativne zone smještene ispod forniksa. Čini se kako se dio stanica koje se u ovom stadiju nakupljaju u osnovi girus dentatusa distribuira prema marginalnoj zoni što upućuje na zajednička svojstva zrnatih stanica girus dentatusa i dijela stanica fetalne marginalne zone.

Iz proliferativne zone medijalnog telencefalona koja se proteže od ganglijskog brežuljka prema dorzalno u koroidni splet te priliježe na dorzolateralnu površinu talamusa stanice migriraju u dorzalni i ventralni talamus (slika 5.91A i 5.91B). Također je prisutno i ganglio-talamičko tijelo kojeg tvore stanice koje migriraju iz ganglijskog brežuljka u talamus (slika 5.91C). Ovo pokazuje kako su proliferativne zone telencefalona potencijalni izvor diencefaličkih neurona.

U ovom stadiju izrazito je masivna nakupina tangencijalno migrirajućih stanica smještena između ganglijskog brežuljka i kaudatusa (slika 5.92 i 5.93). Iako se ne može isključiti da dio stanica odlazi prema ventro-medijalno (slika 5.92A), čini se da je većina usmjerena prema lateralnom ganglijskom brežuljku i ulazi dorzalno kroz lateralni migratorni snop u palijum. Zanimljivo je i kako se stanice na dnu paleokortikalnog ventrikula usmjeravaju prema lateralno i dorzalno i ulaze u ovaj migratorni snop, a ne prema marginalnoj zoni na bazi telencefalona. Ovi podaci pokazuju da tijekom srednjeg fetalnog razdoblja dolazi do povećanja produkcije neurona u ganglijskom brežuljku i broja tangencijalno migrirajućih neurona koji ulaze u palijum.

## Deskriptivna analiza Nissl, Mash1 i AChE rezova

**Slika 5.82** Fetus čovjeka star 11 tjedana, rezovi obojeni Nissl metodom. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli B i C, a pravokutnik označen na panelu C uvećano je prikazan kao panel D.

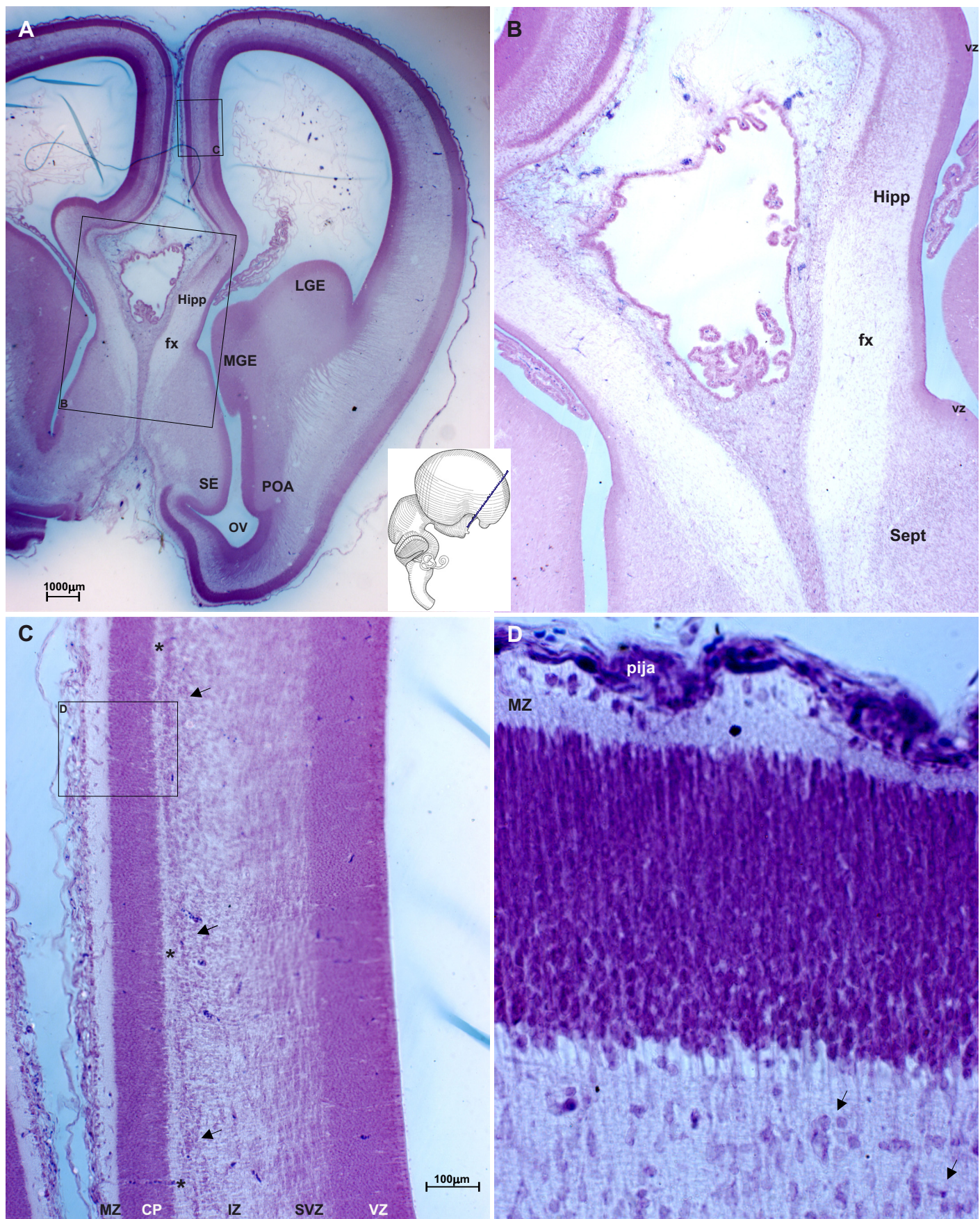
Presjek prolazi kroz rostralni dio telencefalona koji uključuje područje septuma i paleokortikalnog ventrikla (A). Paleokortikalni ventrikul medijalno se nastavlja u septalnu proliferativnu zonu. Prema dorzalno se od septuma prema hipokampusu proteže forniks, a medijalni dio zida od dorzalnog hipokampusa do vrha telencefalona je budući neokorteks. Proliferativna zona ispod forniksa je u kontinuitetu od septuma do osnove dorzalnog hipokampusa (B). Lateralni zid se nastavlja u proliferativnu zonu preoptičkog područja, a zatim zadebljava te se jasno razaznaje medijalni i lateralni ganglijski brežuljak (A).

Neokortikalni dio medijalnog telencefaličkog zida (C) ima tipičnu ranu fetalnu laminaciju, iako je u odnosu na lateralni zid gustoća stanica u subventrikularnoj zoni manja i sama zona ne prelazi širinom ventrikularnu. Neposredno ispod kortikalne ploče je tanak proziran sloj (zvjezdica), ispod kojega se nalazi podsloj sa stanicama koje se grupiraju u otočiće debljine do 5 redova (vrh strelice). Ovaj podsloj se prema dorzalno polako razrjeđuje i nestaje (vrh strelice, D). Marginalna zona je siromašna stanicama i one su uglavnom smještene subpijalno. Prema dorzalno ovaj sloj postaje sve rjeđi i sastavljen je samo od jednog reda stanica. Dojam je kako se u ovom stadiju gustoća subpijalnih stanica smanjuje u odnosu na 9 tjedana starog fetusa (slika 5.10B).

**Slika 5.83** Fetus čovjeka star 11 tjedana, rezovi obrađeni histokemijski na AChE. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao panel B i C.

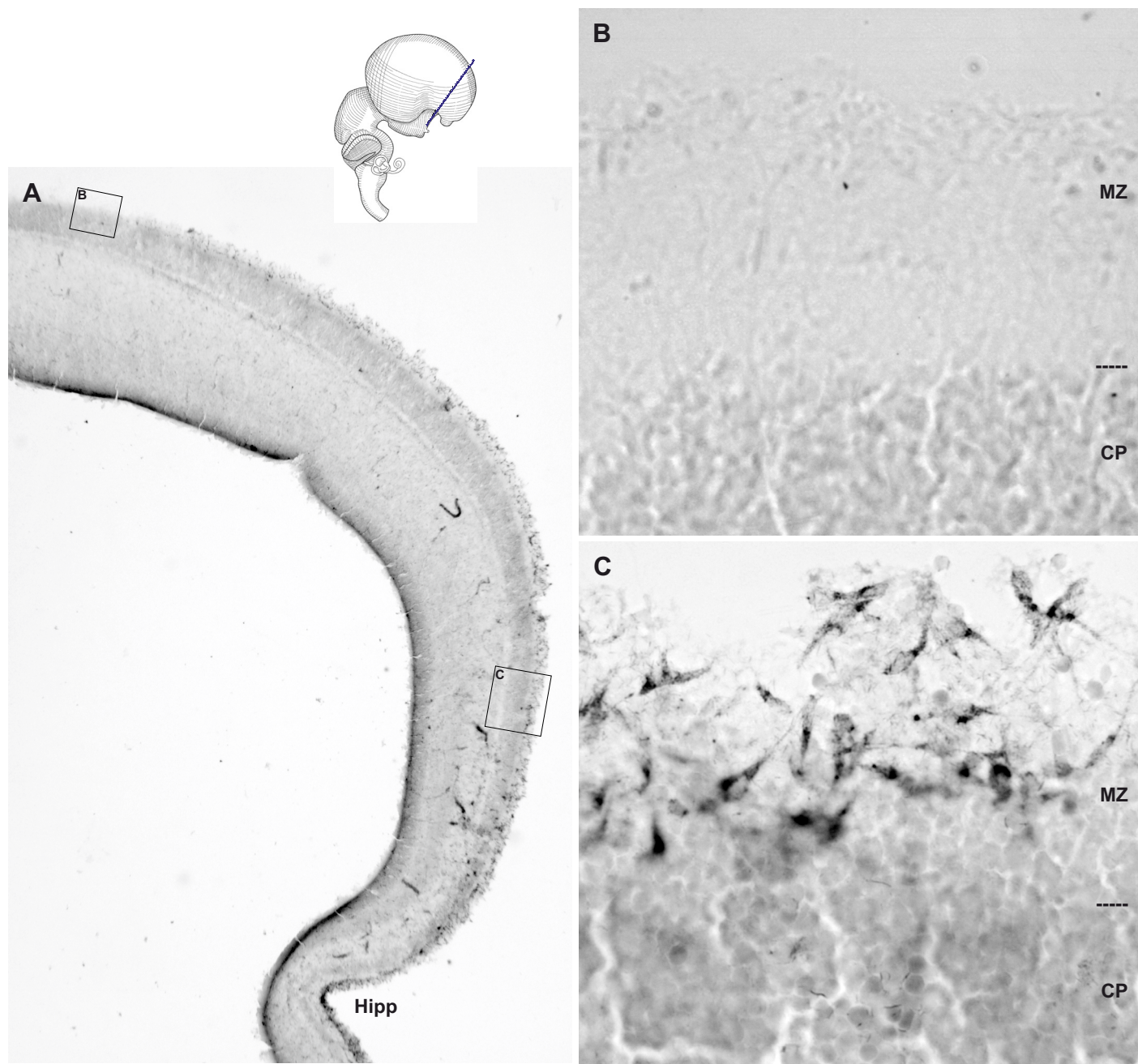
Panel A je koronalni presjek kaudalnog dijela telencefalona na mjestu gdje se spajaju ventralni i dorzalni hipokampus te približno odgovara presjeku na slici 5.13. Paneli A-C prikazuju dorzalni dio medijalne stijenke telencefalona gdje se subpijalno vide brojne gusto poredane, unipolarne i bipolarne AChE pozitivne stanice koje morfologijom i veličinom odgovaraju ranim Cajal-Retziusovim stanicama. Njihova gustoća se smanjuje prema vrhu telencefalona. Dok su u dorzalnog dijelu medijalnog zida (B) one još uvijek brojne, na vrhu telencefalona ih više nema (C) što ukazuje na njihovo porijeklo iz arhikortikalnog dijela medijalnog telencefaličkog zida te migraciju u marginalnu zonu prema dorzalno.





**Slika 5.82** Fetus čovjeka star 11 tjedana, rezovi obojeni Nissl metodom. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao panel B i C, a pravokutnik označen na panelu C uvećano je prikazan kao panel D.





**Slika 5.83** Fetus čovjeka star 11 tjedana, rezovi obrađeni histokemijski na AChE. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao panel B i C.

**Slika 5.84** Fetus čovjeka star 12 tjedana (A) i 13 tjedana (B-D), rezovi obojeni Nissl metodom (A, B) i Golgi impregnirani rezovi (C, D). Pravokutnik označen na panelu C uvećano je prikazan kao panel D.

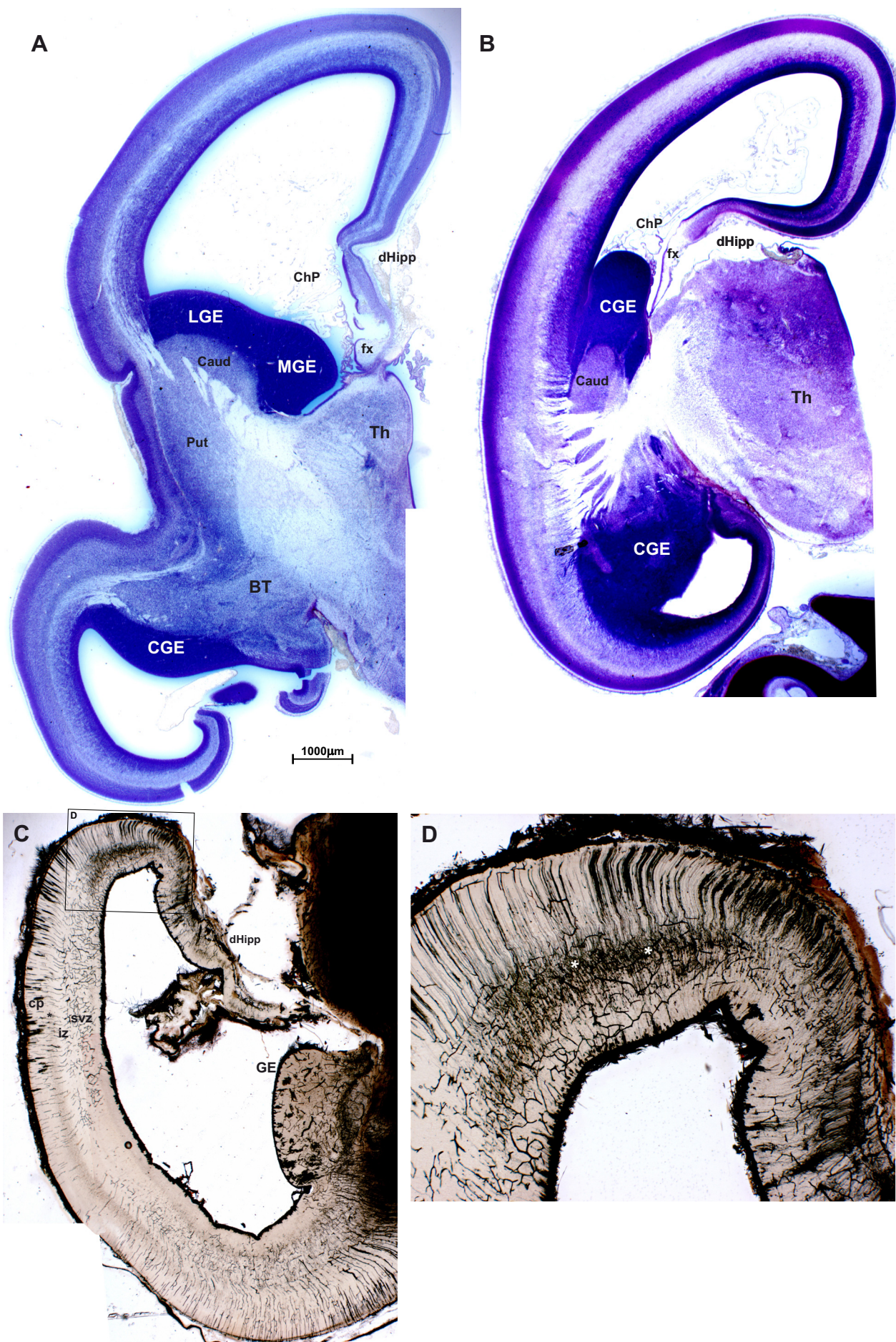
Na kraju ranog fetalnog razdoblja započinje intenzivnije urastanje aksona (A). Vrlo brzo talamokortikalni aksoni masivno urastaju kroz cijelu stijenku i u potpunosti razdvajaju kaudatus od putamena (B). Na Golgi preparatima se u lateralnoj stijenci telencefalona vide brojne radijalno orijentirane stanice, a na temelju pozadinskog bojenja i žilnog crteža može se razaznati šest slojeva: marginalna zona, kortikalna ploča, zona ispod kortikalne ploče (zvjezdica), intermedijalna, subventikularna i ventrikularna zona (C). Na mjestu prelaska dorzalne stijenke telencefalona u medijalni telencefalički zid (neokortiko/mezokortikalna granica) impregnacija je posebno pojačana u dijelu koji odgovara subventrikularnoj i intermedijalnoj zoni (zvjezdica, D). U ovom području mogu se zapaziti brojniji tangencijalni nastavci i tangencijalno orijentirane stanice, što ukazuje kako je to mjesto izrastanja kortikokortikalnih aksona koje prate i tangencijalno migrirajuće stanice.

**Slika 5.85** Fetus čovjeka star 13 tjedana (A, B) i 14 tjedana (C, D), rezovi obojeni Nissl metodom.

U ranijem stadiju (A, B) vidljiva je dodatna laminacija proliferativnih zona. Iako su ventrikularna i subventrikularna zona približno jednako široke, u ventrikularnoj zoni stanice su izrazito gusto poredane dok su u subventrikularnoj grupirane u stupiće. Iznad ovih zona nalazi se zona rjeđe raspoređenih stanica, šira nego ventrikularna i subventrikularna zajedno (oSVZ). U ventralnim dijelovima telencefalona (B) ona je šira, a stanice difuznije razdijeljene u otočiće, dok je dorzalno (A) kompaktnija. U kasnijem stadiju (C) postaje dvostruko šira nego kondenzirani dio proliferativnih zona te difuznije organizirana (C). U najrazvijenijim dijelovima telencefalona, vanjska subventrikularna zona jasno se odvojila (D). U ovom stadiju nije moguće jasno odvojiti ventrikularnu od subventrikularne zone. Obrazac bojenja kondenziranog dijela proliferativnih zona palijuma jednak obrascu bojenja proliferativnih zona ganglijskog brežuljka.

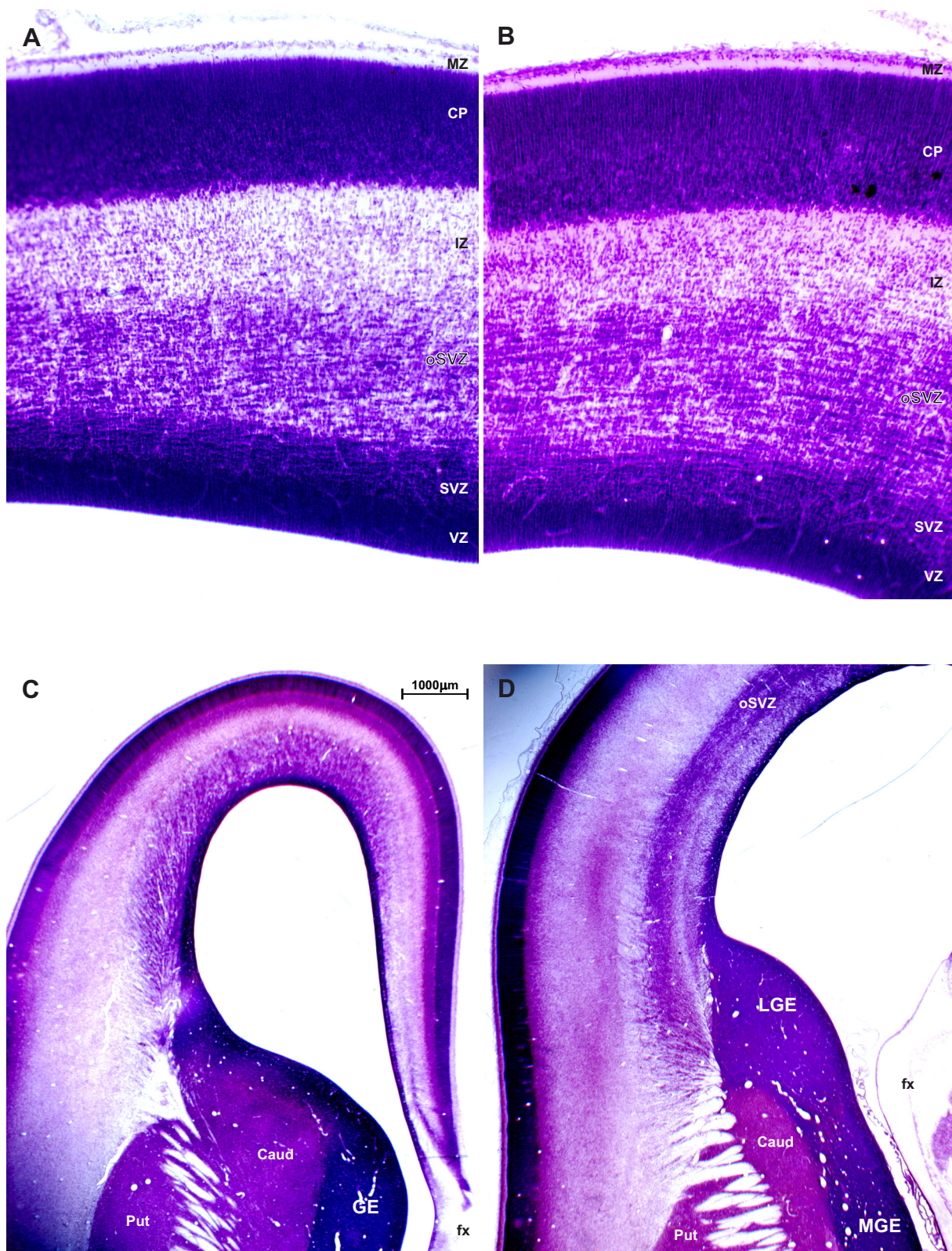
Važna promjena koja se događa u ovom razdoblju je i stvaranje bilaminarne kortikalne ploče. Iako se već s 13 tjedana može učiti fina razlika u gustoći gornjeg i donjeg dijela kortikalne ploče (A, B), ona je još uvijek kompaktna. Tjedan dana kasnije (C, D) jasno je vidljiva bilaminarna struktura kortikalne ploče, s gornjim dijelom koji je tamnije obojen od donje polovice kortikalne ploče.





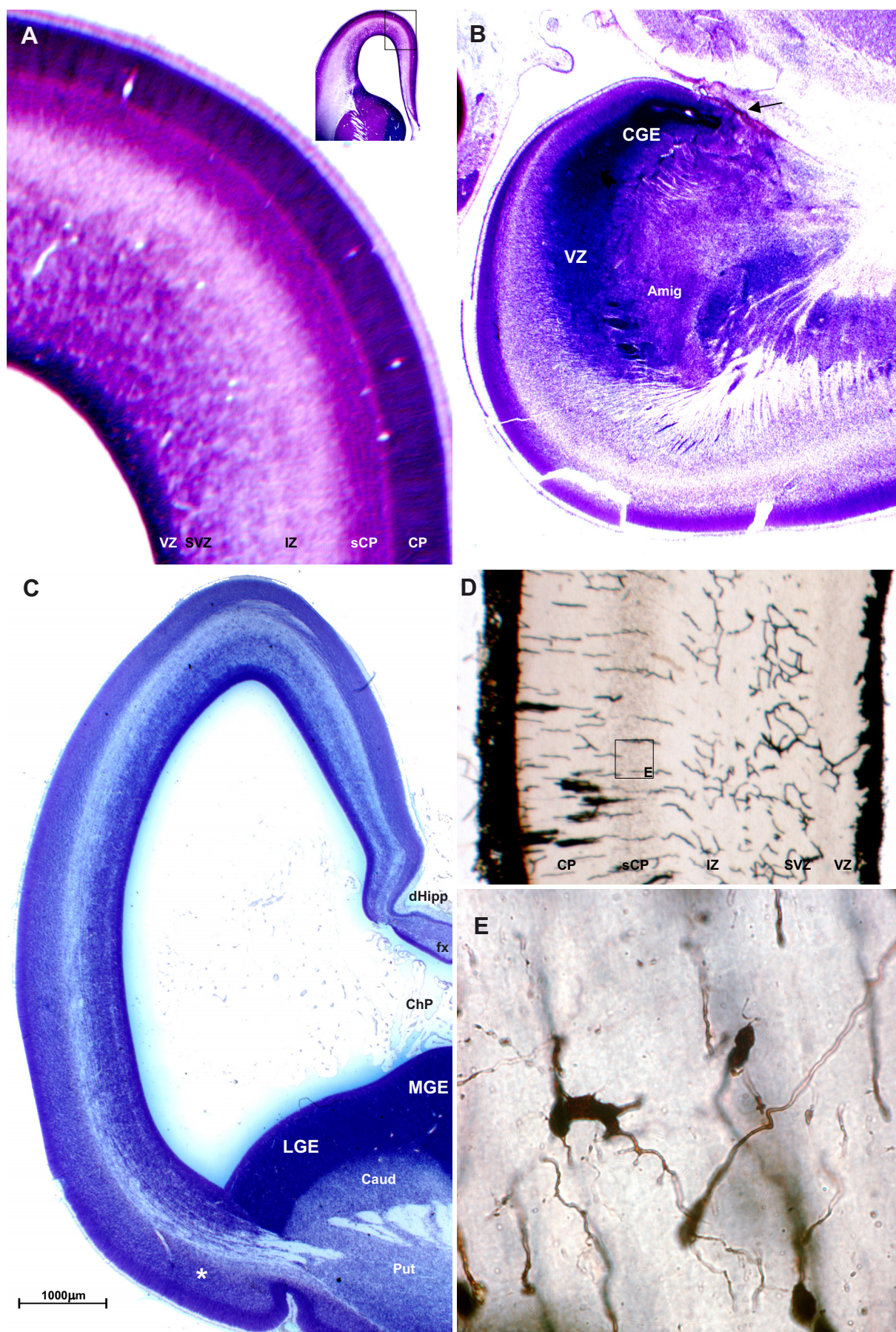
**Slika 5.84** Fetus čovjeka star 12 tjedana (A) i 13 tjedana (B-D), rezovi obojeni Nissl metodom (A, B) i Golgi impregnirani rezovi (C, D). Pravokutnik označen na panelu C uvećano je prikazan kao panel D.





**Slika 5.85** Fetus čovjeka star 13 tjedana (A, B) i 14 tjedana (C, D), rezovi obojeni Nissl metodom.





**Slika 5.86** Fetus čovjeka star 12 tjedna (C), 13 tjedna (B, D, E) i 14 tjedna (A), rezovi obojeni Nissl metodom (A-C) i Golgi impregnirani rezovi (D, E). Panel A prikazuje uvećani dio presjeka prikazanog na slici 5.85C, a točna pozicija prikaza označena je pravokutnikom na umanjenom presjeku reza. Panel D prikazuje dio lateralne stijenke telencefalona sa slike 5.84C, a pravokutnik označen na panelu D uvećano je prikazan kao panel E.

**Slika 5.86** Fetus čovjeka star 12 tjedana (C), 13 tjedana (B, D, E) i 14 tjedna (A), rezovi obojeni Nissl metodom (A-C) i Golgi impregnirani rezovi (D, E). Panel A prikazuje uvećani dio presjeka prikazanog na slici 5.85C, a točna pozicije prikaza označena je pravokutnikom na umanjenom presjeku reza. Panel D prikazuje dio lateralne stijenke telencefalona sa slike 5.84C, a pravokutnik označen na panelu D uvećano je prikazan kao panel E.

U 14 tjedana starog fetusa bilaminarna kortikalna ploča prisutna je i u medijalnom zidu (A), dok je u dva tjedna mlađeg fetusa (C) tek u sredini lateralnog zida vidljiva naznaka bilaminacije kortikalne ploče (zvjezdica). Ovo ukazuje da razdvajanje kortikalne ploče i oblikovanje zone ispod kortikalne ploče započinje u sredini lateralnog telencefaličkog zida te se zatim širi prema ostalim dijelovima telencefalona (slika 5.85C). Na Golgi impregniranim preparatima zona ispod kortikalne ploče vidljiva je po nešto intenzivnijem pozadinskom bojenju (D) i unutar nje se mogu uočiti tangencijalno migrirajuće stanice, ali i već dijelom diferencirane stanice (E).

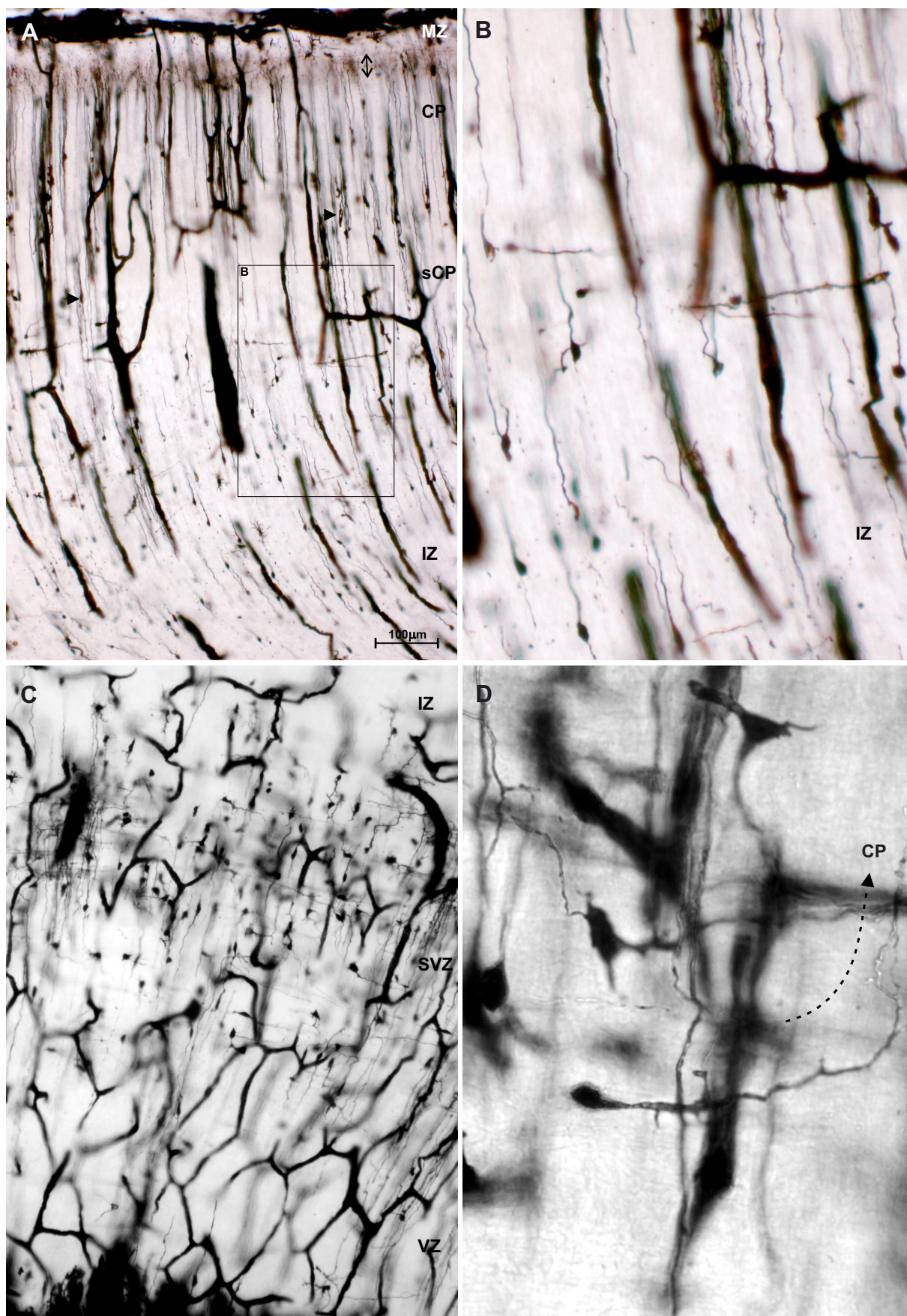
U fetusa starog 13 tjedana (B) u vrhu budućeg temporalnog režnja nalazi se masivna proliferativna zona koja obavlja završetak donjeg roga lateralnih komora. U medijalnom dijelu proliferativna zona nalazi se uz samu pijalnu površinu i u kontinuitetu je s marginalnom zonom i koroidnim spletom (strelica).

**Slika 5.87** Fetus čovjeka star 13 tjedana, Golgi impregnirani rezovi. Pravokutnik označen na panelu A uvećano je prikazan kao panel B.

Tangencijalno orijentirane unipolarne stanice vidljive su u lateralnoj telencefaličkoj stijenci neposredno ispod kortikalne ploče (A, B), a posebno su brojne na granici subventrikularne i intermedijalne zone (C). U gornjem dijelu intermedijalne zone, zoni ispod kortikalne ploče i u samoj kortikalnoj ploči dominiraju bipolarne radijalno orijentirane stanice, od kojih neke u kortikalnoj ploči poprimaju oblik piramidnih neurona (vrh strelice, A).

Na Golgi preparatima granica marginalne zone i kortikalne ploče ima tamnije pozadinsko bojenje (dvostruka strelica, A), što ukazuje na različitu strukturu ovih zona u odnosu na ostatak marginalne zone i kortikalne ploče. Također, u dubini intermedijalne zone (D) mogu se uočiti dobro diferencirani neuroni s uzlaznim aksonom. Na panelu D je također vidljiva i tangencijalno migrirajuća stanica koja se odvaja iz vrha tangencijalno migrirajućeg snopa i kreće prema kortikalnoj ploči (strelica).





**Slika 5.87** Fetus čovjeka star 13 tjedana, Golgi impregnirani rezovi. Pravokutnik označen na panelu A uvećano je prikazan kao panel B.

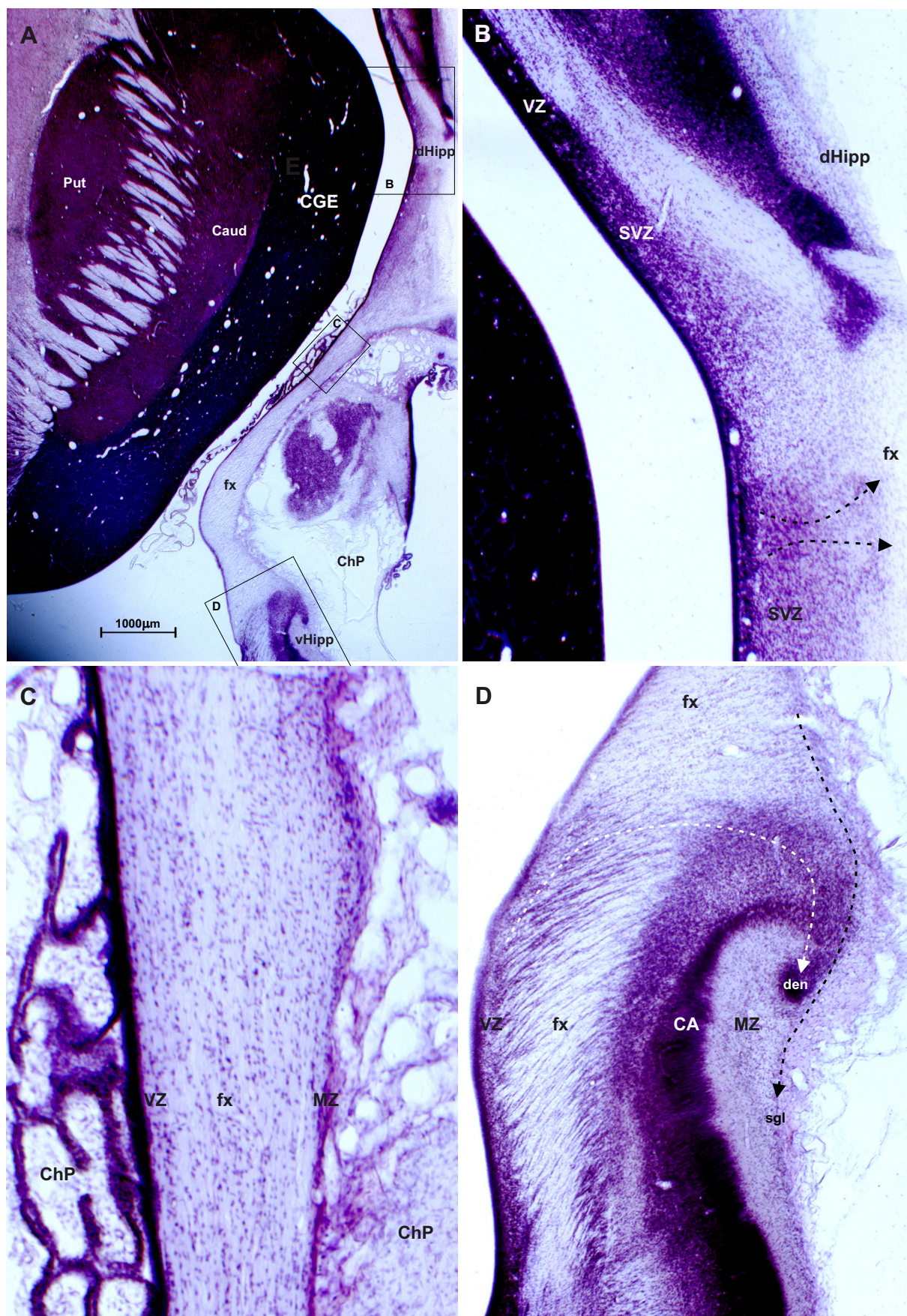
**Slika 5.88** Fetus čovjeka star 14 tjedana, rezovi obojen Nissl metodom. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli B-D.

Na koronalnom presjeku koji prolazi nešto rostralnije od mjesta gdje se spajaju ventralni i dorzalni hipokampus (A), vidljiva je dobro razvijena proliferativna zona ispod dorzalnog hipokampusa i masa stanica koja migrira prema pijalnoj površini (B). Ventralnije (C), u području forniksa ventrikularna zona je tanka, ali još uvijek intenzivno obojena, a brojne stanice gusto su razbacane kroz sam foniks. Ove stanice na pijalnoj površini oblikuju sloj koji se ventralno i dorzalno nastavlja u marginalnu zonu, dok u području ventralnog hipokampusa (D) prolaze uz stanice koje počinju oblikovati girus dentatus te se nastavljaju u marginalnu zonu (vidi i sliku 5.89A).

**Slika 5.89** Fetus čovjeka star 13 tjedana (B, D) i 14 tjedana (A, C), rezovi obojen Nissl metodom.

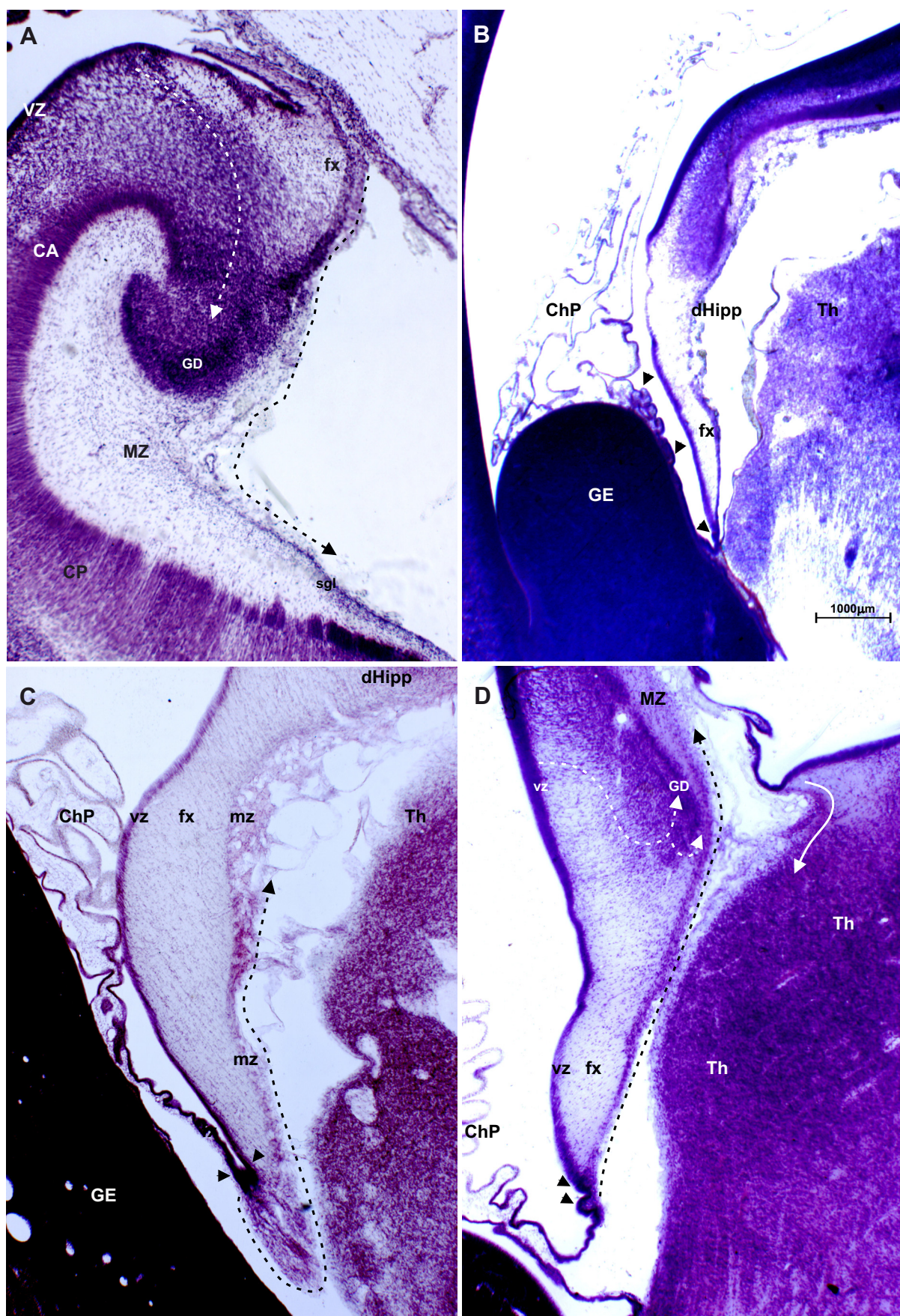
Na panelu A jasno se vidi kontinuitet stanica smještenih na površini forniksa koji preko girus dentatusa nastavljaju migraciju prema marginalnoj zoni (crna isprekidana strelica). Čini se da stanice koje se u ovom stadiju nakupljaju kod osnove girus dentatusa dolaze iz dva izvora: iz proliferativne zone koja je nastavak proliferativnih zona hipokampusa (bijela isprekidana strelica) te iz proliferativne zone smještene ispod forniksa. Kako podaci pokazuju da se zrnati neuroni girus dentatusa počinju stvarati krajem prvog tromjesečja trudnoće, moguće je da se dio stanica koje se u ovom stadiju nakupljaju u osnovi girus dentatusa distribuira prema marginalnoj zoni što upućuje na zajednička svojstva znatih stanica girus dentatusa i dijela stanica fetalne marginalne zone. Na početku druge trećine trudnoće još uvijek je dobro razvijena spojna proliferativna zona prema koroidnom spletu, kao i proliferativna zona proksimalnog dijela koroidnog spleta (vrhovi strelice, B-D). Od ove zone vidljiv je jasan kontinuitet migratornih stanica prema marginalnoj zoni telencefalona (crna isprekidana strelica, C i D), ali i prema dorzalnog dijelu talamusa (bijela strelica, D). Ovo ukazuje da su proliferativna zona smještena ispod forniksa, spojna proliferativna zona prema koroidnom spletu, a moguće i dio koroidnog spleta, značajan izvor stanica marginalne zone na početku srednje trećine trudnoće.





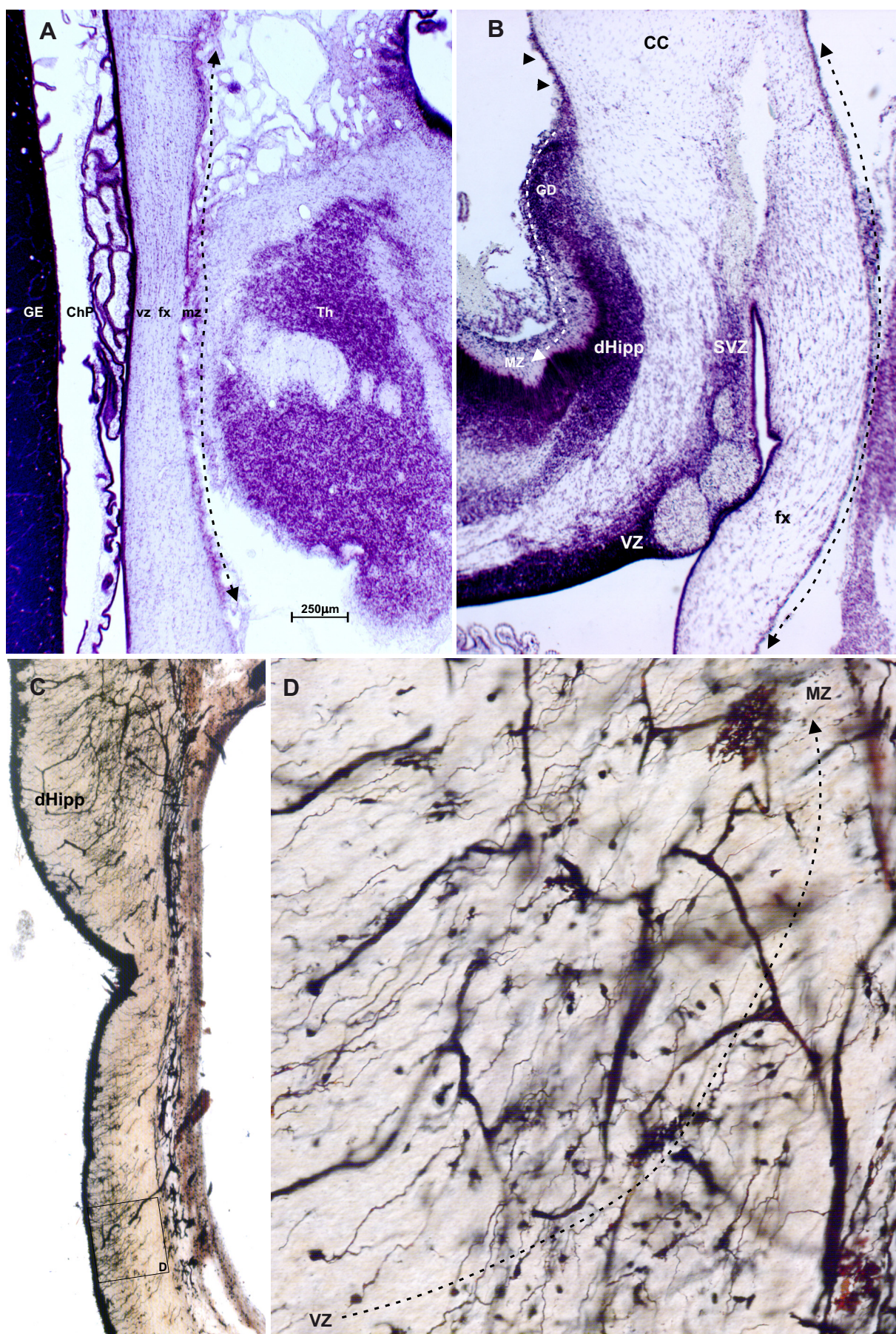
**Slika 5.88** Fetus čovjeka star 14 tjedana, rezovi obojen Nissl metodom. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli B-D.





**Slika 5.89** Fetus čovjeka star 13 tjedana (B, D) i 14 tjedana (A, C), rezovi obojen Nissl metodom.





**Slika 5.90** Fetus čovjeka star 14 tjedana (A, B) i 13 tjedana (C, D), rezovi obojeni Nissl metodom (A, B) i Golgi impregnirani rezovi (C, D). Pravokutnik označen na panelu C uvećano je prikazan kao panel D.

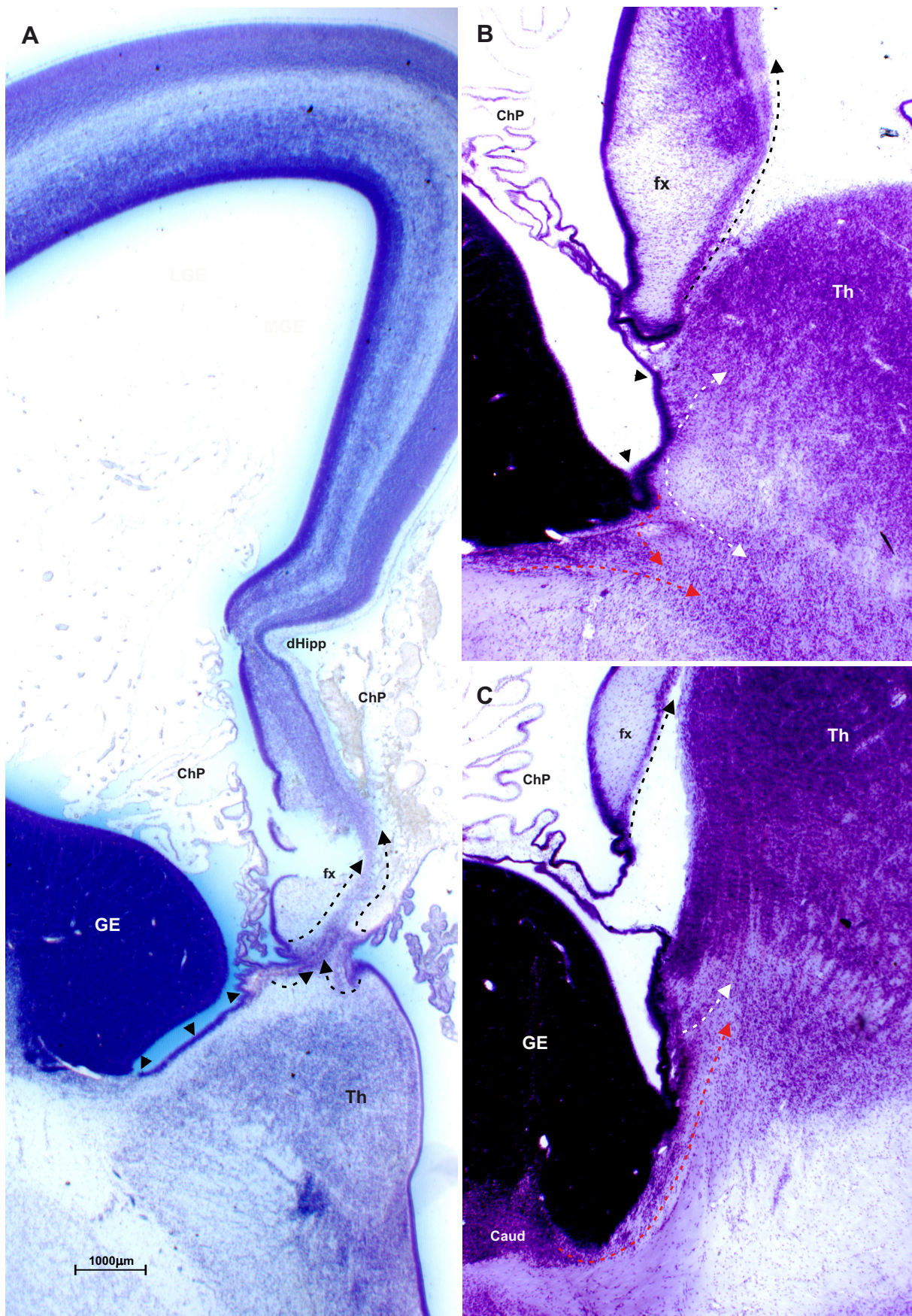
**Slika 5.90** Fetus čovjeka star 14 tjedana (A, B) i 13 tjedana (C, D), rezovi obojeni Nissl metodom (A, B) i Golgi impregnirani rezovi (C, D). Pravokutnik označen na panelu C uvećano je prikazan kao paneli D.

Proliferativna zona ispod fornika je stanjena, ali intenzivno obojena (A, B), što ukazuje na daljnju proliferaciju. U subkalozalnom dijelu (B) proliferativna zona zadebljava i unutar nje se mogu razaznati jasni snopovi aksona iznad kojih se nalazi subventrikularna zona. Na oba panela jasno je vidljiv kontinuitet stanica ispod pije (isprekidana strelica). Stanice su prisutne i na dorzalnom dijelu korpus kalozuma (vrh strelice, B) te se nastavljaju prema girus dentatusu i zatim dalje u marginalnu zonu telencefalona (bijela strelica). U medijalnom telencefaličkom zidu (C i D) subpijalno su smještene tangencijalno orijentirane stanice koje se nastavljaju prema marginalnoj zoni. Ovo ukazuje da je proliferativna zona medijalnog telencefaličkoga zida početkom srednje trećine trudnoće glavni izvor neurona marginalne zone.

**Slika 5.91** Fetus čovjeka star 14 tjedana (A, B) i 13 tjedana (C, D), rezovi obojeni Nissl metodom.

Panel A prikazuje koronalni presjek kroz prednji dio talamusa, a panel B i C kroz središnji dio talamusa. Vrhovi strelica pokazuju na dio proliferativne zone medijalnog telencefalona koja se proteže od ganglijskog brežuljka prema dorzalno u koroidni splet te priliježe na dorzolateralnu površinu talamusa (A, B). Iz ovog područja stanice migriraju u dorzalni i ventralni talamus (bijeke isprekidane strelice, B i C), a dijelom oblikuju ganglio-talamičko tijelo kojeg tvore stanice koje migriraju iz ganglijskog brežuljka u talamus (crvene isprekidane strelice, B i C). Iz graničnog područja proliferativnih zona koroidnog spleta, i u telencefaličkom dijelu (spojna proliferativna zona prema koroidnom spletu lateralne moždane klijetke), i u krovu treće moždane klijetke, prema dorzalno u telencefalon migriraju stanice (isprekidane strelice, A). Ovo ukazuje da stanice koje migriraju u marginalnu zonu telencefalona potječu i iz diencefaličkih proliferativnih zona, ali da i proliferativne zone telencefalona mogu biti izvor diencefaličkih neurona.





**Slika 5.91** Fetus čovjeka star 14 tjedana (A, B) i 13 tjedana (C, D), rezovi obojeni Nissl metodom.

**Slika 5.92** Fetus čovjeka star 13 tjedana, Golgi impregnirani rezovi. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli B i C.

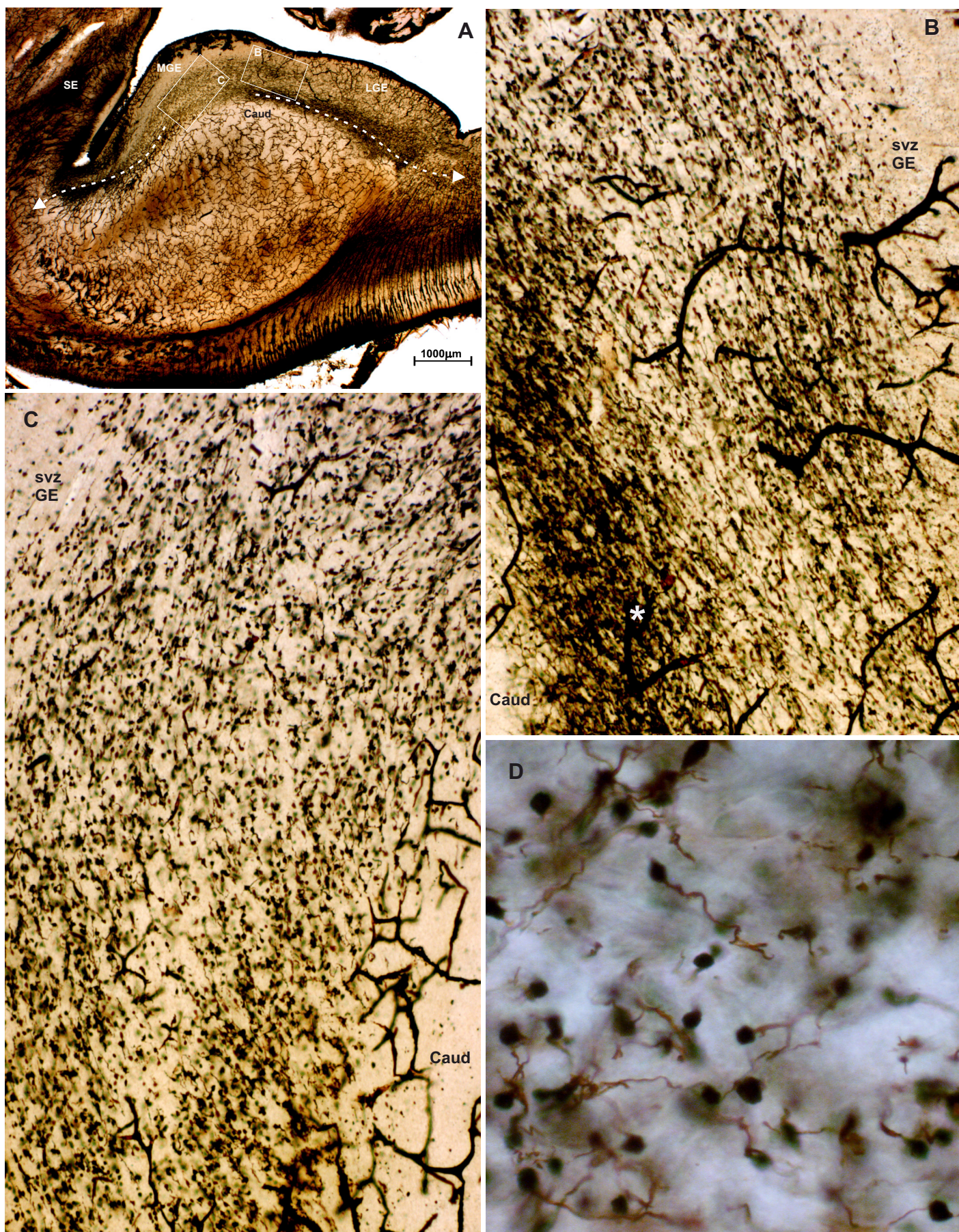
Panel A prikazuje koronalni presjek kroz rostralni dio telencefalona u području septuma. Na granici prema kaudatusu iznad medijalnog i lateralnog ganglijskog brežuljka proteže se snop tangencijalno migrirajućih stanica. Snop je podijeljen u dva dijela (B i C): dio bliže ganglijskom brežuljku i dio uz kaudatus. Stanice su posebno gusto poredane u snopu uz kaudatus u području lateralnog ganglijskog brežuljka (zvjezdica, B), kao i u oba snopa u području paleokortikalnog ventrikula (A). Panel D pokazuje uvećane stanice tipične migratorne morfologije unutar migratornog snopa.

**Slika 5.93** Fetus čovjeka star 13 tjedana, Golgi impregnirani rezovi. Paneli prikazuju uvećane dijelove s presjeka 5.92A.

Panel A prikazuje septalno područje, panel B dorzalni lateralni telencefalički zid, panel C područje oko paleokortikalnog ventrikula, a panel D prijelaz subpalijuma u palijum u području granice lateralnog ganglijskog brežuljka i palijalne proliferativne zone.

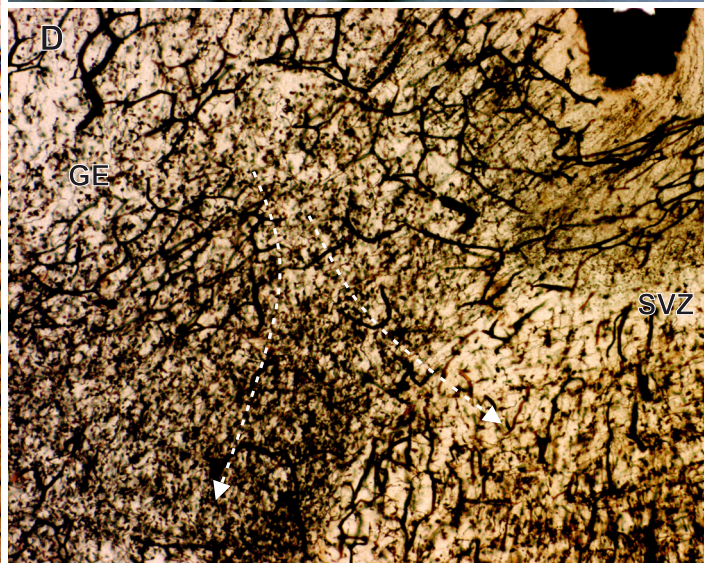
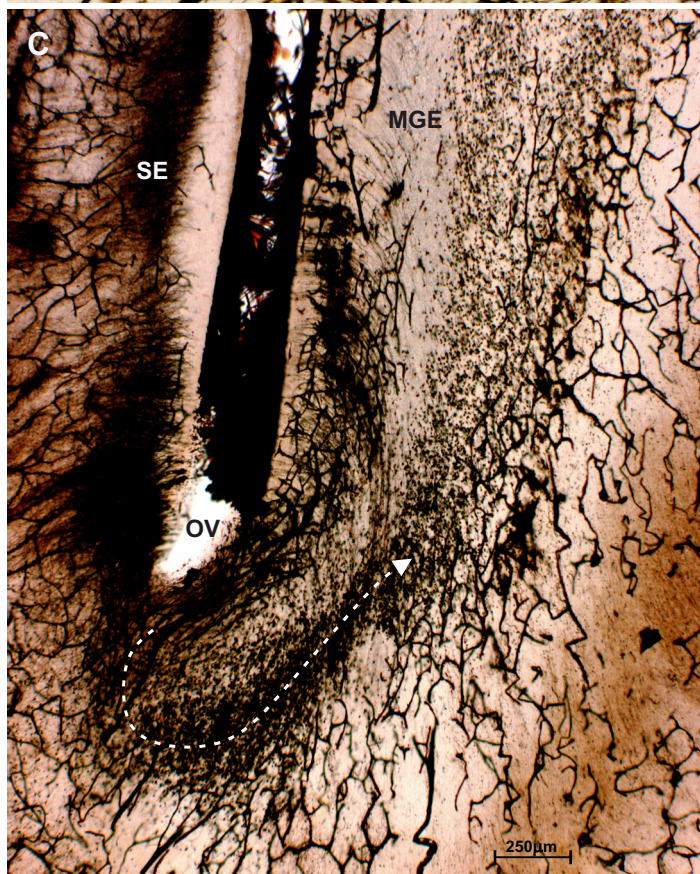
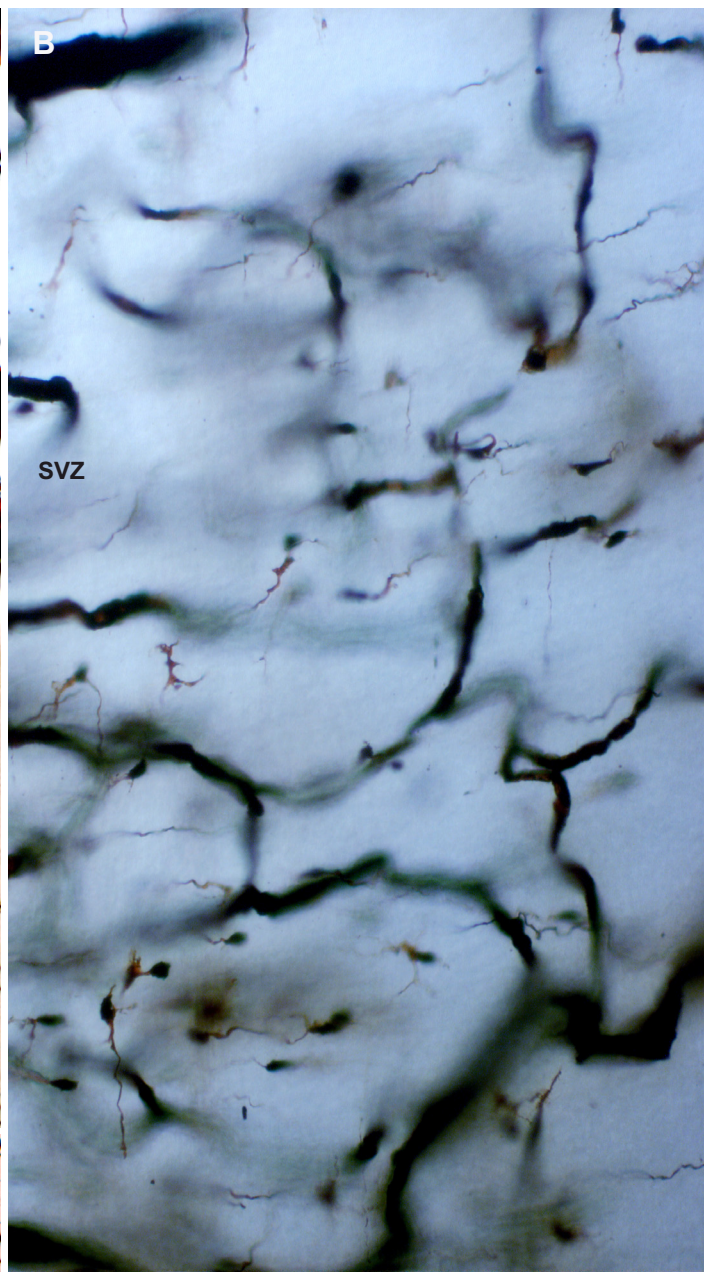
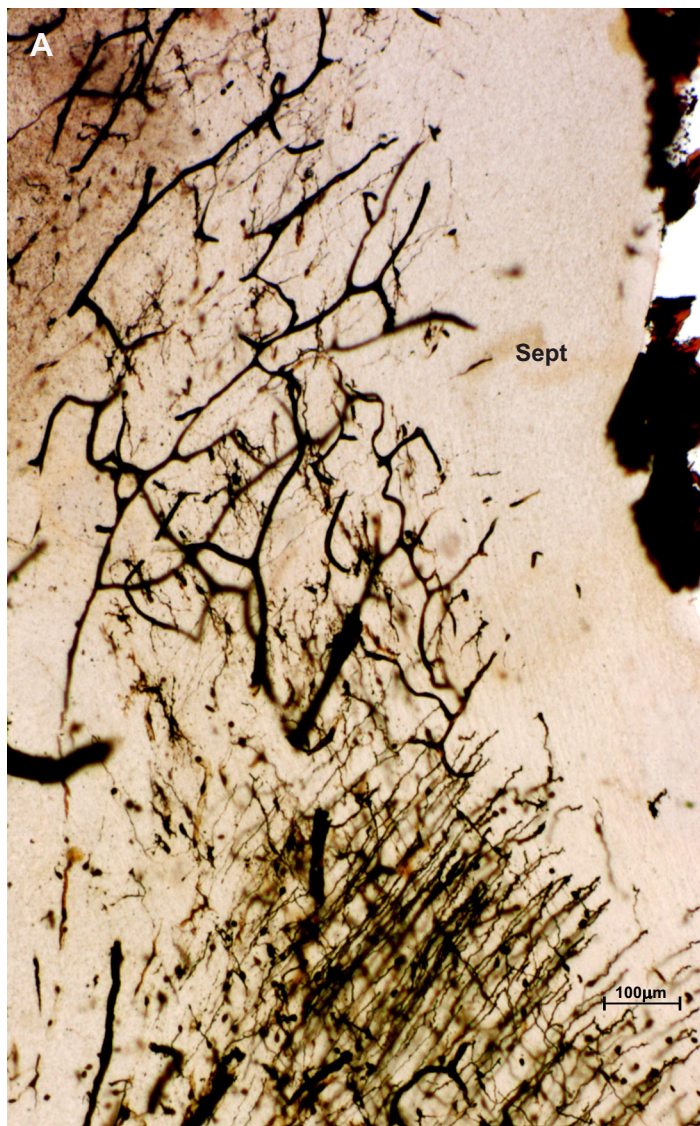
U području septuma (A) samo sporadično se mogu uočiti tangencijalno migrirajuće stanice, dok se u području paleokortikalnog ventrikla (C) nalazi masa tangencijalno migrirajućih stanica. Iako se u ranijem stadiju (slika 5.12) stanice usmjeravaju bazalno prema palijalnoj površini, u ovom stadiju stanice su usmjerene u migratorni snop koji se proteže između ganglijskog brežuljka i strijatuma (isprekidana strelica, C). U području dorzalnog telencefalona (B) tangencijalno migrirajuće stanice nalaze se prvenstveno u subventrikularnoj zoni. Iznad krajnjeg lateralnog dijela ganglijskog brežuljka (D) nalaze se najgušće poredane tangencijalno migrirajuće stanice što potvrđuje kako najveći dio stanica koje napuštaju ganglijski brežuljak i ide prema palijumu prolaze kroz ovo područje.





**Slika 5.92** Fetus čovjeka star 13 tjedana, Golgi impregnirani rezovi. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli B i C.





**Slika 5.93** Fetus čovjeka star 13 tjedana, Golgi impregnirani rezovi. Paneli prikazuju uvećane dijelove s presjeka 5.92A.



### 5.2.3 Tangencijalna migracije u majmuna između 64. i 68. embrionalnog dana

U stadiju E60-E70 u majmuna citoarhitektonska slika istovjetna je kao kod fetusa čovjeka u dobi 12-14 tjedana (slika 5.94 i 5.95). Kortikalna ploča ima bilaminarnu organizaciju, s gusto zbijenim stanicama u gornjem dijelu i rjeđe postavljenim stanicama u donjem dijelu (slika 5.94C). Na Nissl preparatima gornji dio subventrikularne zone se razrjeđuje, ali nema jasno izražene vanjske subventrikularne zone (slika 5.95B).

U ovom stadiju visoko reaktivne Mash1 stanice nalaze se u ganglijskom i septalnom brežuljku, a posebno gusto su poredane u ventrikularnoj zoni.

U palijumu je vidljiva Mash1 reaktivnost u stanicama ventrikularne zone, ali i vanjskog dijela subventrikularne zone (slika 5.94D, 5.95A, 5.95C i 5.95D). Ventrikularna zona ima bilaminarnu Mash1 reaktivnost (slika 5.94E).

Intenzivna GAD65 reaktivnost prisutna je u većini, ako ne i u svim stanicama proliferativnih zona bazalnog telencefalona, kao i u migratornim stanicama koje napuštaju ove proliferativne zone (slika 5.96). Strijatum, septum, kao i bazalni telencefalon imaju visok stupanj reaktivnosti kroz gotovo cjelokupno područje. Ova se reaktivnost nastavlja kroz marginalnu zonu prema dorzalno kako kroz lateralni, tako i kroz medijalni telencefalički zid (slika 5.96A). Intenzivna GAD65 reaktivnost prisutna je kroz hipotalamus te se nastavlja od ventrikularne zone bazalno i oko optičkog tračka prema marginalnoj zoni (slika 5.96A). Također, snop gusto poredanih reaktivnih stanica proteže se kroz ventrikularnu zonu medijalnog telencefaličkog zida prema dorzalno (slika 5.95E, 5.95F i 5.96A), gdje se u ventrikularnoj zoni počinju zapažati okrugle intenzivno GAD65 reaktivne stanice (slika 5.95E, 5.95F). Kako većina ovih stanica u gornjoj trećini ventrikularne zone izražava Mash1 i GAD65 reaktivnost (slika 5.95G) jasno se može zaključiti da se radi o proliferativnim stanicama i da u ovom stadiju započinje produkcija GABA-ergičkih neurona i u palijumu. Također, u gornjem dijelu subventrikularne i u zoni iznad subventrikularne zone se kroz cjelokupan telencefalički zid vide gusto isprepletene GAD65 pozitivne unipolarne stanice koje su neradijalno orijentirane (slika 5.94F i 5.95E).

Ovi podaci ukazuju kako u srednjem fetalnom razdoblju dolazi do daljnjeg povećanja produkcije GABA-ergičkih neurona u proliferativnim zonama bazalnog telencefalona i migracije prema palijumu. Najveći put je iz lateralnog ganglijskog brežuljka u lateralni i dorzalni palijum, ali velik broj budućih neurona iz septalnog i preoptičkog područja (slika 5.96A), ali i iz hipotalamusa (slika 5.97A) ulazi u medio-bazalnom dijelu u marginalnu zonu. Također, vidljivo je da stanice iz septuma migriraju kroz medijalni telencefalički zid prema dorzalno, kroz marginalnu zonu, ali i gornji dio kortikalne ploče (slika 5.96D). GAD reaktivnost u proliferativnim zonama palijuma je jednim velikim dijelom vezana uz

progenitore, što ukazuje da značajna produkcija GABA-ergičkih neurona započinje u ovom razdoblju i u palijumu.

Također, proliferativna zona u vrhu temporalnog režnja (slika 5.97), koja je u kontinuitetu s proliferativnom zonom hipokampusa i spoja s koroidnim spletom, dobro je razvijena i od nje kroz medijalnu stijenku preko girus dentatusa stanice odlaze u marginalnu zonu. Broj stanica koje iz medijalnog telencefaličkog zida i forniksa ulaze u marginalnu zonu povećava se kroz analizirano razdoblje (slika 5.98), tako da se u majmuna E70 (slika 5.99) na prijelazu forniksa u hipokampus subprijalno stvara debeli sloj gusto zbijenih stanica koje su poredane u 5 do 10 redova i dalje se nastavljaju u marginalnu zonu neokorteksa. Ove subprijalno smještene gusto zbijene stanice intenzivno su reaktivne na kalretinin. Jednim dijelom ove kalretinin pozitivne stanice mogle bi odgovarati malim GAD67 reaktivnim stanicama (slika 5.100A i 5.100B). Marginalna zona u kaudalnim dijelovima telencefalona počinje pokazivati složeniju strukturu (slika 5.100C) kakvu će u sljedećem stadiju poprimiti cjelokupan telencefalon. Stoga se može pretpostaviti da je izvor GAD67 pozitivnih stanica (slika 5.100B) koje migriraju kroz marginalnu zonu u kaudalnim dijelovima telencefalona, ali također da dio ovih stanica migrira i kroz zonu ispod ploče (slika 5.100A). Međutim, GAD67 reaktivne stanice nisu toliko brojne u ostalim zonama telencefaličkog zida kao što je to slučaj s kalretininskim stanicama (slika 5.100D, 5.100E, 5.101 i 5.102). Broj i distribucija kalretininskih stanica više odgovara distribuciji migratornih GAD65 stanica.

Za razliku od GAD ekspresije, subprijalno smještene Cajal-Retziusove stanice intenzivno izražavaju kalretinin. Najveću gustoću imaju u sredini medijalnog telencefaličkog zida u kaudalnom dijelu telencefalona (slika 5.101) što ukazuje da je to zona njihova porijekla. Ove stanice izražavaju i intenzivnu kalbindinsku reaktivnost i posebno se gusto nakupljaju upravo u medijalnoj stijenci kaudalnog dijela telencefalona (slika 5.103). U istom području su u dubini između hipokampalnih ploča smještene velike nakupine gusto poredanih malih kalbindin pozitivnih stanica (slika 5.100A i 5.100B). Najvjerojatnije se radi o zrnatim stanicama girus dentatusa, ali nije isključeno da će se dio tih stanica transformirati u Cajal-Retziusove i kroz marginalnu zonu doputovati u odgovarajuće područje palijuma. Ovo ukazuje na mogućnost da zrnate stanice girus dentatusa i dio stanica marginale zone potječu od iste skupine progenitora. Za razliku od kalretinina, kalbindinska reaktivnost vidljiva je i u stanicama proliferativne zone koje se nalaze na spoju s koroidnim spletom (slika 5.103D).

Kalbindin i kalretinin reaktivne stanice u proliferativnim zonama vidljive su u stanjenom dijelu medijalnog telencefaličkog zida koji je prirastao uz talamus (slika 5.104). Reaktivnost i usmjerenje nakupina stanica u ovom području pokazuje kako stanice medijalnog telencefaličkog zida, koje se stvaraju na spoju prema koroidnom spletu i u proksimalnom dijelu samog koroidnog spleta, ne migriraju samo prema telencefalonu, već i u dorzalni dio talamusa.



Iako u stijenci telencefalona dominiraju migratorne GAD65 pozitivne stanice (slika 5.105), u određenim slojevima vide se i brojni GAD67 migratorni, ali i diferencirani neuroni (slika 5.106A i 5.106B). Najveća gustoća GAD67 pozitivnih stanica je u marginalnoj zoni, gdje dominiraju tangencijalno migrirajuće stanice. U lateralnim dijelovima telencefalona, na granici marginalne zone s kortikalnom pločom (slika 5.106B), mogu se uočiti veći, dijelom diferencirani neuroni. Morfološki najbliži velikim GAD67 pozitivnim stanicama na granici marginalne zone i kortikalne ploče su somatostatin pozitivne stanice (slika 5.106C), ali se na istoj poziciji mogu zamijetiti i pojedine kalretinin (slika 5.102B) i kalbindin (slika 5.107A) pozitivne stanice koje započinju s diferencijacijom, a čini se da dio stanica izražava i GAD65 (slika 5.107B). Čini se da osim diferenciranih stanica na rubu marginalne zone prema kortikalnoj ploči te velikih subpikalno smještenih Cajal-Retziusovih stanica, migratorne stanice marginalne zone ne eksprimiraju kalbindin (slika 5.107A). Gusto bojenje u srednjoj trećini marginalne zone prvenstveno odgovara vlaknima (iako dio reaktivnosti ima jasne obrise stanica), a u istoj zoni se također vidi i GAD65 reaktivnost (slika 5.107B). Subpikalno smještene Cajal-Retziusove stanice ne pokazuju GAD reaktivnost. Brojne velike diferencirane kalbindin reaktivne stanice vidljive su u gornjem dijelu kortikalne ploče entorinalnog područja (slika 5.108A).

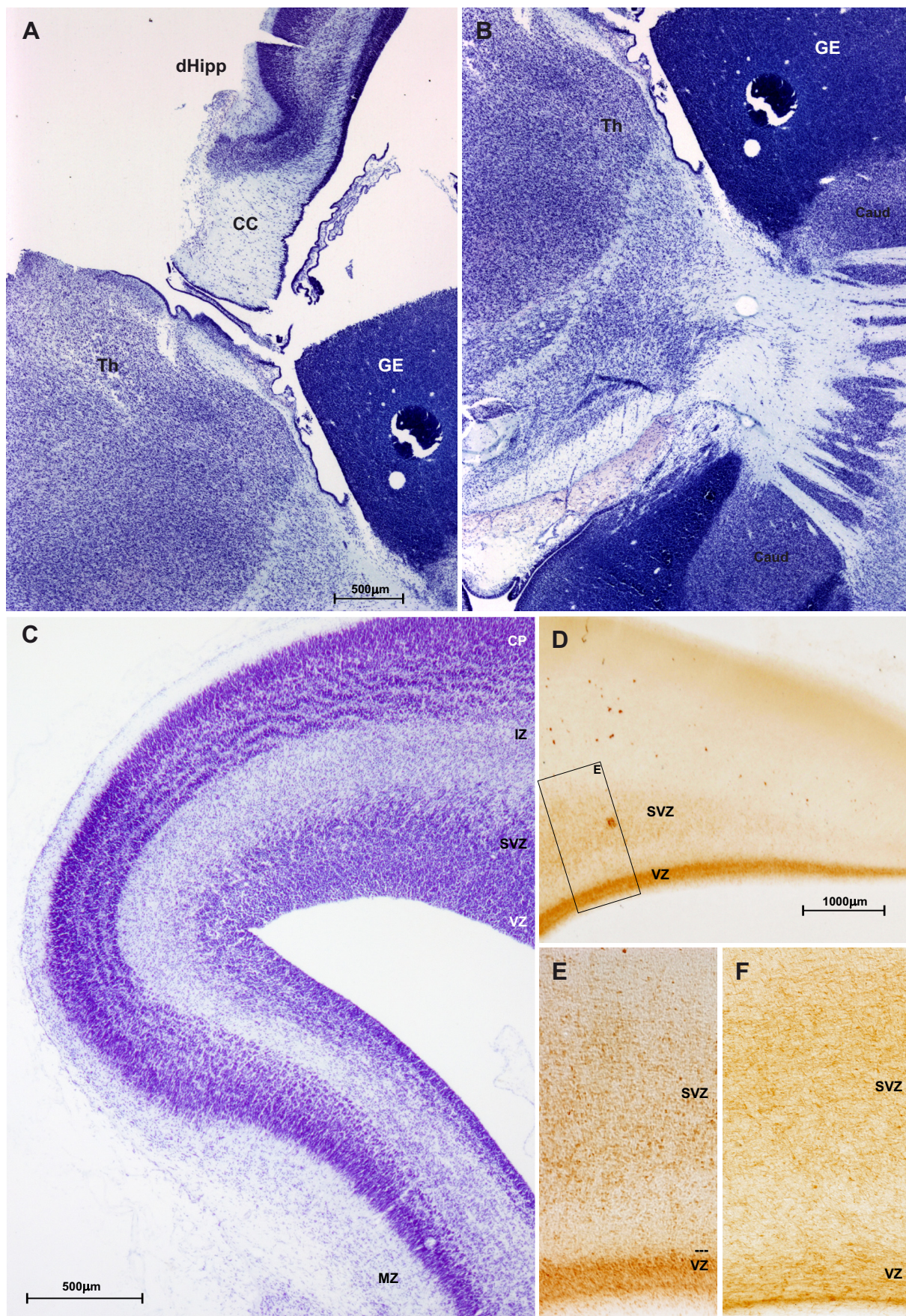
U neokortikalnim dijelovima od diferenciranih stanica dominiraju somatostatinske stanice koje su u pravilnom nizu (slika 5.108B) smještene na granici marginalne zone i kortikalne ploče (slika 5.108D-G). No, somatostatinske stanice mogu se sporadično zapaziti i subpikalno, kao i kroz cijelu širinu marginalne zone. Ove stanice nemaju horizontalnu bipolarnu morfologiju kao Cajal-Retziusove stanice. Morfologija diferenciranih somatostatinskih stanica se poklapa s diferenciranim intenzivno reaktivnim GAD67 stanicama. Osim u marginalnoj zoni, stanice koje su započele s diferencijacijom nalaze se ispod kortikalne ploče i poredane su u dva sloja (slika 5.109A). Deblji sloj nalazi se ispod kortikalne ploče te odgovara širini same kortikalne ploče (slika 5.109B). Drugi sloj je smješten dublje, na samom dnu intermedijalne zone (slika 5.109D), ali se stanice sporadično vide i kroz cijelu intermedijalnu zonu. Iako se sporadično mogu naći i multipolarne stanice, ove stanice su uglavnom jednostavnije piriformne ili bipolarne morfologije. Na granici kortikalne ploče i sloja ispod kortikalne ploče mogu se uočiti i brojne intenzivno reaktivne, somatostatinske, bipolarne, radijalno orijentirane stanice s dugačkim nastavcima (slika 5.109C). Ovi podaci ukazuju da je ispod kortikalne ploče, a izvan osnove budućih kortikalnih slojeva, već tijekom ranog fetalnog razdoblja oblikovana bogata GABA-ergička neuralna mreža.

## **Deskriptivna analiza Nissl, Mash1, GAD65, GAD67, kalbindinskih i kalretininških rezova**

**Slika 5.94** Majmun E64, rezovi obojeni Nissl metodom (A-C), rezovi obrađeni imunohistokemijski na Mash1 (D, E) i GAD65 (F). Pravokutnik označen na panelu D uvećano je prikazan kao panel E. Panel F odgovara području prikazanom na panelu E.

U ovom razdoblju glavni snopovi aksona, korpus kalozum (A) i kapsula interna (B), dobro su razvijeni. Kortikalna ploča ima bilaminarnu organizaciju, s gusto zbijenim stanicama u gornjem dijelu i rjeđe postavljenim stanicama u donjem dijelu (C). Na Nissl preparatima gornji dio subventrikularne zone se razrjeđuje, ali nema jasno izražene vanjske subventrikularne zone (C). Međutim, na Mash1 preparatima (D, E) vidljiva je laminarna distribucija Mash1 reaktivnih stanica u proliferativnim zonama palijuma. Ventrikularna zona, koja obuhvaća relativno usko područje uz klijetku, intenzivno je Mash1 reaktivna i bilaminarno organizirana. U dijelu ventrikularne zone uz samu klijetku nema Mash1 reaktivnih stanica, no neposredno iznad nalazi se tanak sloj visoko reaktivnih stanica. Ovaj sloj odvojen je nereaktivnom zonom od gornje trećine ventrikularne zone koja je ispunjena intenzivno reaktivnim Mash1 stanicama gusto zbijenim u 3-5 redova. Ovaj obrazac sličan je obrascu reaktivnosti u ventrikularnoj zoni ganglijskog brežuljka. U donjoj trećini subventrikularne zone Mash1 reaktivne stanice su rijetke, dok se u preostalom dijelu nalaze brojne Mash1 reaktivne stanice, ali manje gusto poredane nego u ventrikularnoj zoni. Za razliku od ventrikularne zone gdje stanice uglavnom imaju visoku ekspresiju Mash1, u subventrikularnoj zoni stanice imaju različit stupanj ekspresije. Također, GAD65 reaktivni neuroni (F) pokazuju distribuciju koja se podudara s distribucijom Mash1 reaktivnih stanica (E), što ukazuje kako je Mash1 ekspresija vezana uz proliferaciju GABA-ergičkih neurona.





**Slika 5.94** Majmun E64, rezovi obojeni Nissl metodom (A-C), rezovi obrađeni imunohistokemijski na Mash1 (D, E) i GAD65 (F). Pravokutnik označen na panelu D uvećano je prikazan kao panel E. Panel F odgovara području prikazanom na panelu E.

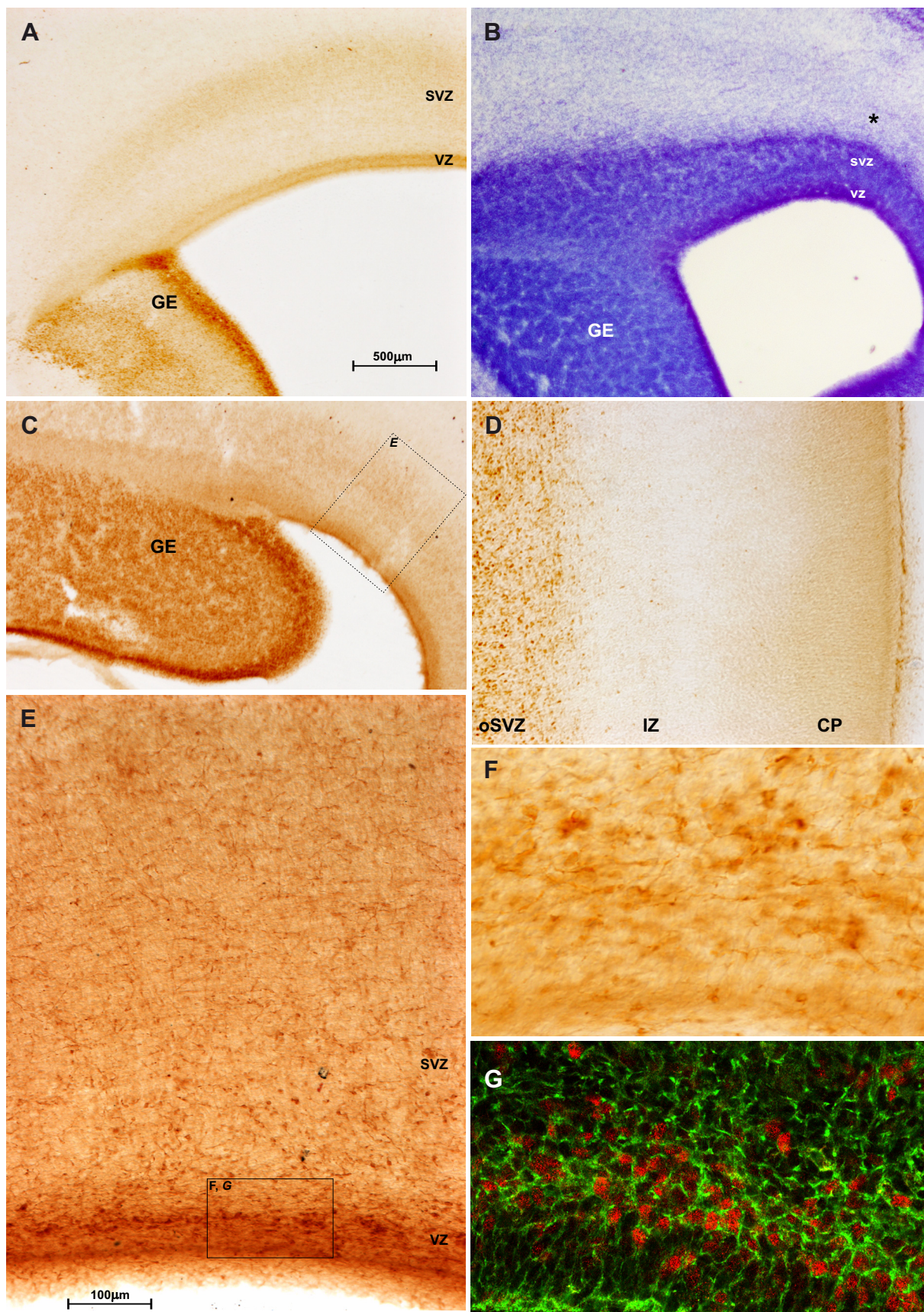


**Slika 5.95** Majmun E64 (A) i E68 (B-G), rezovi obojeni Nissl metodom (B), rezovi obrađeni imunohistokemijski na Mash1 (A, C, D) i GAD65 (E, F) te dvostruko bojenje (G) na GAD65 (zeleno) i Mash1 (crveno). Pravokutnik označen na panelu C odgovara području prikazanom na panelu E. Pravokutnik označen na panelu E uvećano je prikazan kao panel F te odgovara području prikazanom na panelu G.

Na Nissl preparatima u stadiju E68 gornji dio subventrikularne zone više nije razrijeđen kao u stadiju E64 (slika 5.94C), već je subventrikularna zona kompaktna (B). Sloj između proliferativnih zona i kortikalne ploče može se podijeliti na donji dio s većom gustoćom stanica (zvjezdica, B) i gornji dio s rijetkim stanicama. Iznad kondenzirane subventrikularne zone nalaze se Mash1 pozitivne stanice (A, D). Ovi podaci ukazuju kako stanice gornjeg dijela subventrikularne zone koja se u stadiju E64 razrjeđuje (slika 5.94C), u stadiju E68 formiraju novu zonu širine ventrikularne i subventrikularne zone (B). U ovoj zoni gustoća stanica je 3-4 puta manja nego u kondenziranom dijelu subventrikularne zone, što je vjerojatno posljedica ispreplitanja stanica s urastajućim aksonima. Stanice u ovoj zoni odgovaraju proliferativnim stanicama koje će u sljedećem stadiju oblikovati dobro razvijenu vanjsku subventrikularnu zonu, na što ukazuju i gusto poredane, intenzivno Mash1 reaktivne stanice ove zone u središnjem dijelu telencefalona (C). Na Mash1 preparatima može se uočiti i gradijent pozadinskog bojenja prema pijalnoj površini: uz piju je vidljiva tanja zona koja odgovara marginalnoj, a zatim su vidljive tri zone (D). Najpovršnije smještena tamna zona odgovara gornjoj polovici kortikalne ploče, gdje su stanice gusto poredane; zatim zona sa svjetlijim bojenjem koja odgovara donjem dijelu kortikalne ploče koji se razrjeđuje (odgovara sloju pod pločom) te izrazito svijetla zona urastajućih vlakana koja odgovara pravoj intermedijalnoj zoni.

U ventrikularnoj zoni, kao i u gornjem dijelu subventrikularne i u zoni iznad subventrikularne zone, vidljiva je velika gustoća GAD65 pozitivnih stanica (E, F). U subventrikularnoj zoni dominiraju horizontalno orijentirane stanice s jednim nastavkom, najvjerojatnije migrirajući GABA-ergički neuroni. Oni su posebno gusto poredani u zoni iznad subventrikularne te Mash1 reaktivnost ove zone može odgovarati stanicama koje migriraju iz ganglijskog brežuljka. Međutim, u gornjem dijelu ventrikularne zone, u kojemu je također intenzivna i Mash1 reaktivnost (slika 5.94E,) vidljive su intenzivne GAD65 okrugle stanice (F), istovjetne morfologije i intenziteta bojenja kao i u ganglijskom brežuljku. Kako većina ovih stanica u gornjoj trećini ventrikularne zone pokazuje Mash1 i GAD65 reaktivnost (G) jasno se može zaključiti da se radi o proliferativnim stanicama i da u ovom stadiju započinje produkcija GABA-ergičkih neurona i u palijumu.





**Slika 5.95** Majmun E64 (A) i E68 (B-G), rezovi obojeni Nissl metodom (B), rezovi obrađeni imunohistokemijski na Mash1 (A, C, D) i GAD65 (E, F) te dvostruko bojenje (G) na GAD65 (zeleno) i Mash1 (crveno). Pravokutnik označen na panelu C odgovara području prikazanom na panelu E. Pravokutnik označen na panelu E uvećano je prikazan kao panel F te odgovara području prikazanom na panelu G.

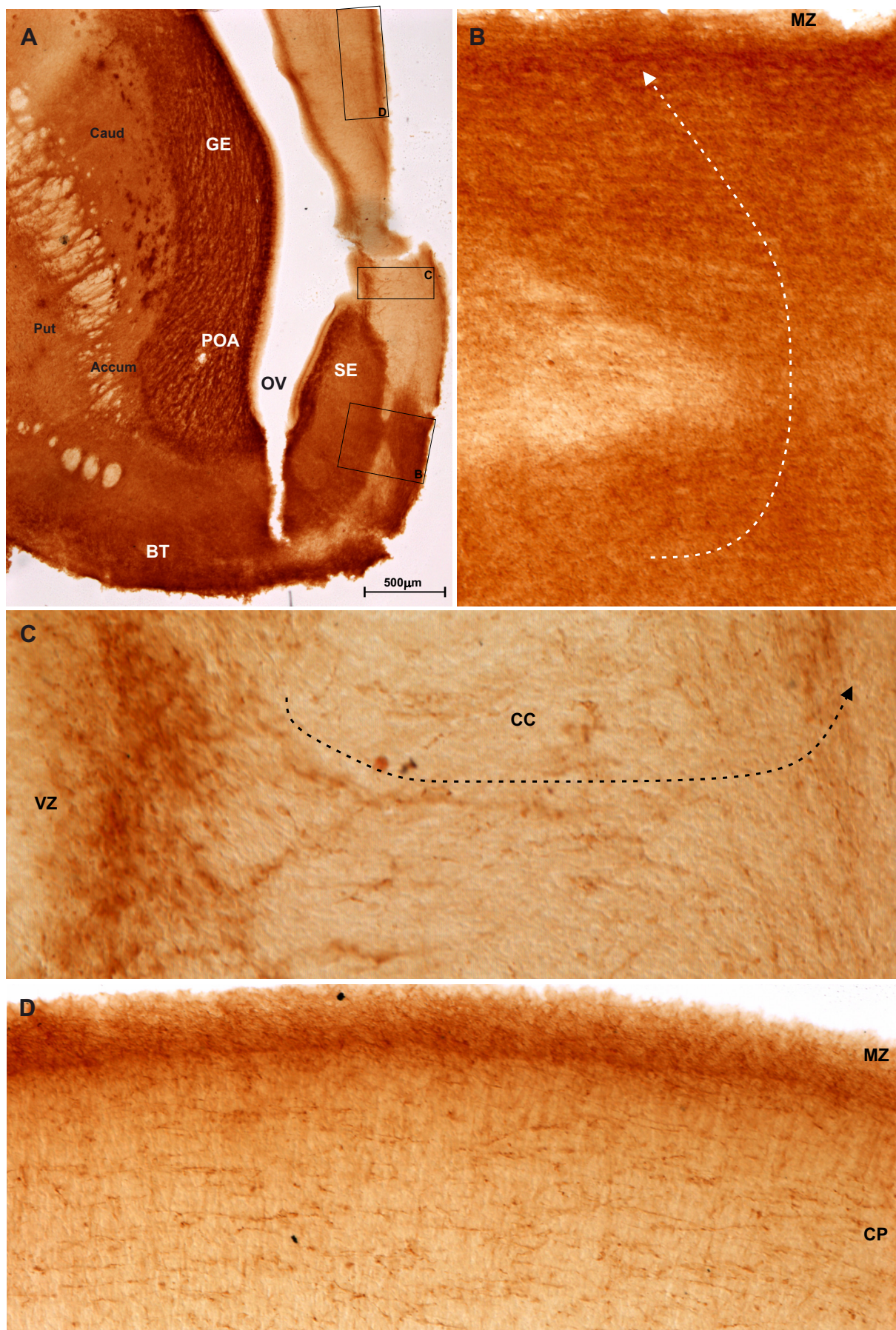
**Slika 5.96** Majmun E64, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD65. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli B-D.

Koronalni presjek prolazi kroz rostralni dio telencefalona u području septalnog brežuljka i paleokortikalnog ventrikulate rostralnog dijela komisuralne ploče (A). Intenzivna GAD65 reaktivnost vidljiva je u ganglijskom brežuljku izuzev najdubljeg dijela ventrikularne zone, dok ostatak ventrikularne zone pokazuje izrazito visoku reaktivnost koja je posljedica gusto zbijenih stanica u ovom dijelu. Reaktivnost je vidljiva i u strijatumu, ali značajno slabija nego u ganglijskom brežuljku. Gusto poredane GAD65 reaktivne stanice prisutne su i u području od ganglijskog brežuljka prema bazalnom telencefalonu. U središnjem dijelu septuma neposredno ispod kalozalne ploče (panel B rotiran za 100° u smjeru suprotnom od kazaljke na satu) od ventrikularno prema pijalno nalaze se gusto poredane intenzivno reaktivne GAD65 stanice koje se grupiraju na pijalnoj površini tvoreći vrlo gust i intenzivno reaktivan GAD65 sloj. Ovaj debeli površinski sloj proteže se prema ventralnom dijelu telencefalona ispod paleokortikalnog ventrikula (A) te nešto stanjen po medijalnom telencefaličkom zidu prema dorzalno. U sredini medijalnog telencefaličkog zida (C) od subkalozalne GAD65 reaktivne proliferativne zone protežu se tračci stanica prema pijalnoj površini. U ventrikularnoj zoni su, izuzev najdubljeg dijela, GAD65 pozitivne stanice gusto poredane u 8-10 redova te se protežu prema dorzalno u ventrikularnu zonu medijalnog telencefaličkog zida (A). U gornjoj polovici stijenke medijalnog telencefaličkog zida dorzalno od kalozalne ploče (panel D rotiran za 85° u smjeru suprotnom od kazaljke na satu) marginalna zona je gusto ispunjena nastavcima koji imaju izgled vodećeg nastavka migratornih neurona. Brojni takvi nastavci vidljivi su i u ostalim dijelovima, ali više ispod kortikalne ploče. Od pijalnog dijela koji se nalazi neposredno dorzalno od kalozalne ploče (A), GAD65 reaktivnost nastavlja se dorzalno prema marginalnoj zoni, ali i ispod kortikalne ploče. Iako je moguće da intenzitet GAD65 reaktivnosti izvan proliferativnih zona potječe od aksona, obrazac bojenja jasno ukazuje da u bazalnom i septalnom dijelu telencefalona postoji gomilanje migratornih stanica prema piji, a zatim prema dorzalno kroz medijalni telencefalički zid i lateralno kroz bazalni dio telencefalona.

**Slika 5.97** Majmun E64, rez obrađen imunohistokemijski na GAD65 (A) i rezovi obojeni Nissl metodom (B-E). Pravokutnik označen na panelu D uvećano je prikazan kao panel E. Pravokutnik označen na panelu E uvećano je prikazan na slici 5.98C.

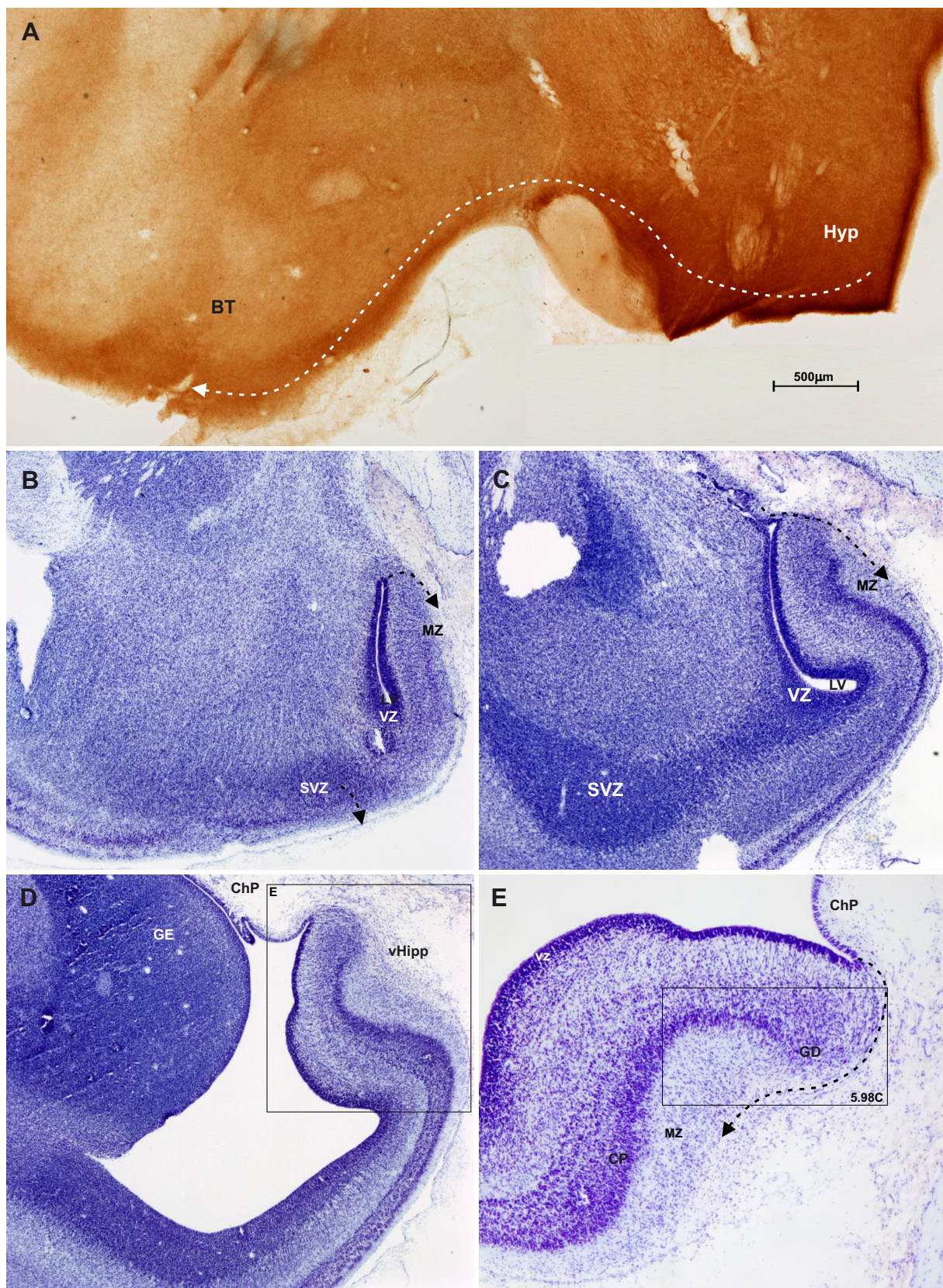
Panel A prikazuje kaudalniji presjek od presjeka na slici 5.96A te prolazi kroz rostralni hipotalamus (preoptičko područje) i vrh temporalnog režnja. U proliferativnoj zoni hipotalamusa obrazac GAD65 reaktivnosti istovjetan je obrascu u septalnom području. Intenzivno je reaktivna i bazalna površina diencefalona. GAD65 reaktivnost vidljiva je kroz cijeli hipotalamus uz gradijent smanjenja od ventralno prema dorzalno. Reaktivnost se





**Slika 5.96** Majmun E64, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD65. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli B-D.





**Slika 5.97** Majmun E64, rez obrađen imunohistokemijski na GAD65 (A) i rezovi obojeni Nissl metodom (B-E). Pravokutnik označen na panelu D uvećano je prikazan kao panel E. Pravokutnik označen na panelu E uvećano je prikazan na slici 5.98C.



nastavlja i prema medijalnom dijelu temporalnog režnja, uz gradijent smanjenja od medijalno prema lateralno. Reaktivnost iz ventralnog dijela hipotalamusa proteže se preko optičkog traktusa u marginalnu zonu vrha temporalnog režnja, što ukazuje kako je ovo put migracije iz preoptičkog područja prema telencefalonu (isprekidana strelica).

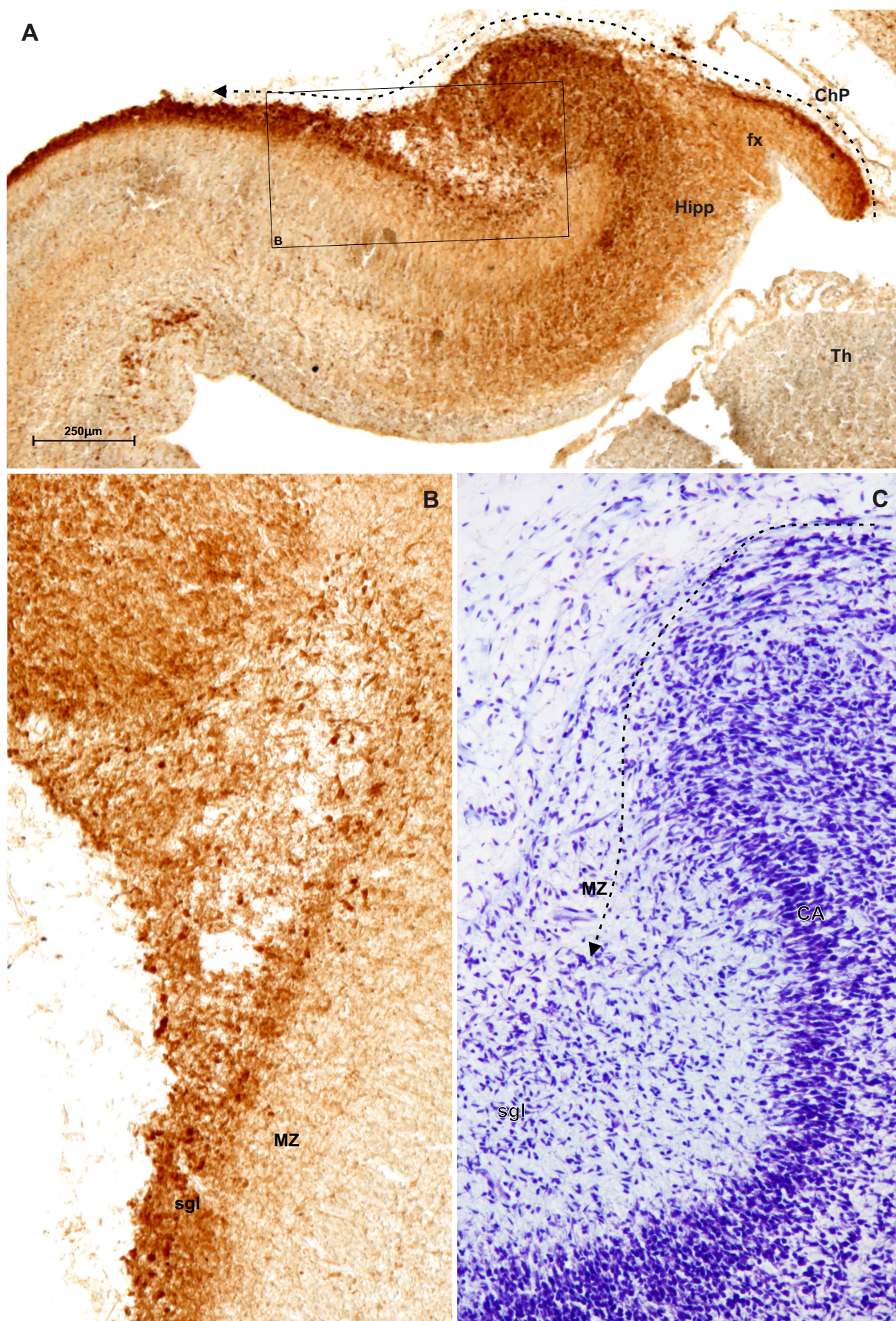
Paneli B-D prikazuju citoarhitektoniku vrha temporalnog režnja (donjeg roga lateralne klijetke) od rostralno prema kaudalno i nastavljaju se na razinu prikazanu na panelu A. Proliferativna zona vrha temporalnog režnja nalazi se blizu pijalne površine (B). Kaudalnije, stanice iz medijalnog dijela proliferativne zone oko vrha klijetke usmjerene su subpijalno prema marginalnoj zoni (isprekidana strelica, C), da bi se zatim ovaj dio proliferativne zone nastavio u proliferativnu zonu spoja s koroidnim spletom (D). Panel E prikazuje migraciju stanica od spojne zone koroidnog spleta i hipokampusa prema marginalnoj zoni.

**Slika 5.98** Majmun E68, rez obrađen imunohistokemijski na kalretinin (A, B) i E64, rez obojen Nissl metodom (C). Pravokutnik označen na panelu A uvećano je prikazan kao panel B. Panel C prikazuje područje označeno pravokutnikom na slici 5.97E.

Panel A prikazuje presjek kroz hipokampus, a panel B je rotiran za 90° u smjeru suprotnom od kazaljke na satu. Migratorne stanice koje prelaze preko završetka hipokampalne ploče (C) ulaze u hilus hipokampusa gdje se gomilaju te zatim ulaze u marginalnu zonu. Stanice smještene na površini medijalnog telencefaličkog zida iznad forniksa gusto su zbijene i izražavaju kalretinin (A) te se iznad hipokampalne ploče protežu prema neokortikalnoj marginalnoj zoni gdje su također gusto zbijene (B). Ovakav obrazac ukazuje da migratorne stanice medijalnog telencefaličkog zida preko hipokampusa ulaze u marginalnu zonu neokorteksa po kojoj dalje migriraju.

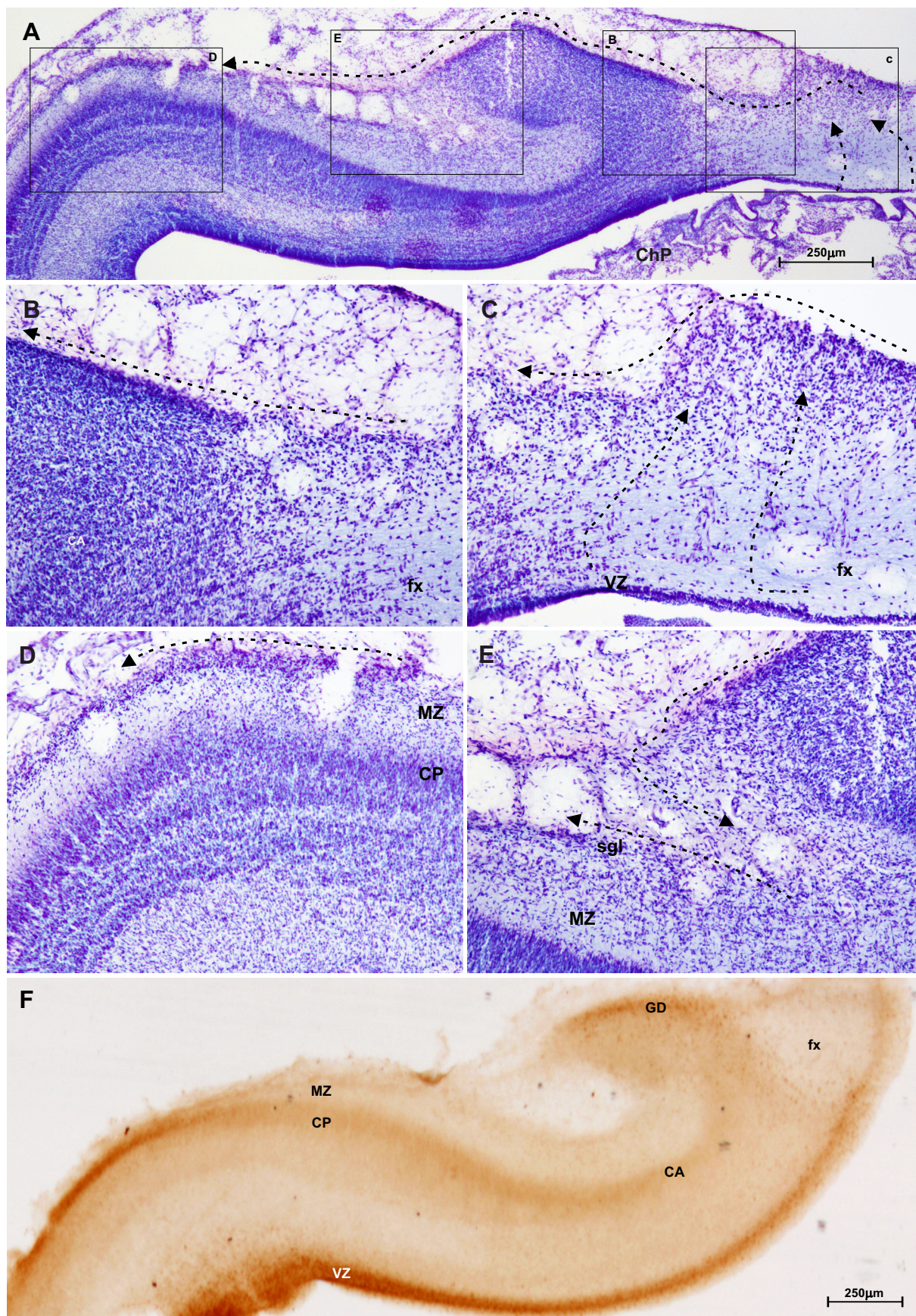
**Slika 5.99** Majmun E70, rezovi obojeni Nissl metodom (A-E) i E68, rez obrađen imunohistokemijski na Mash1 (F). Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli B-E.

Panel A prikazuje presjek kroz hipokampus, susjedna mezokortikalna područja (subikulum i entorinalno područje) i forniks. U odnosu na prethodni stadij (slike 5.97 i 5.98) bolje je razvijen foniks na čijoj površini se vidi nakupljanje stanica s gradijentom povećanja gustoće prema pijalno (C). Ovaj sloj stanica se zgušnjava prema hipokampusu (B) te se dalje proteže prema dorzalno (E) u 5-10 gusto poredanih redova stanica koje tvore subpijalni podsloj unutar marginalne zone neokorteksa (D). Vidljivo je kako se ove stanice nalaze iznad Mash1 reaktivnih stanica u osnovi dentatusa (F) te nije isključeno kako budući progenitori zrnatih stanica dentatusa zajedno sa subfornikalnom proliferativnom zonom medijalnog telencefaličkog zida stvaraju stanice koje migriraju prema marginalnoj zoni neokorteksa.



**Slika 5.98** Majmun E68, rez obrađen imunohistokemijski na kalretinin (A, B) i E64, rez obojen Nissl metodom (C). Pravokutnik označen na panelu A uvećano je prikazan kao panel B. Panel C prikazuje područje označeno pravokutnikom na slici 5.97E.





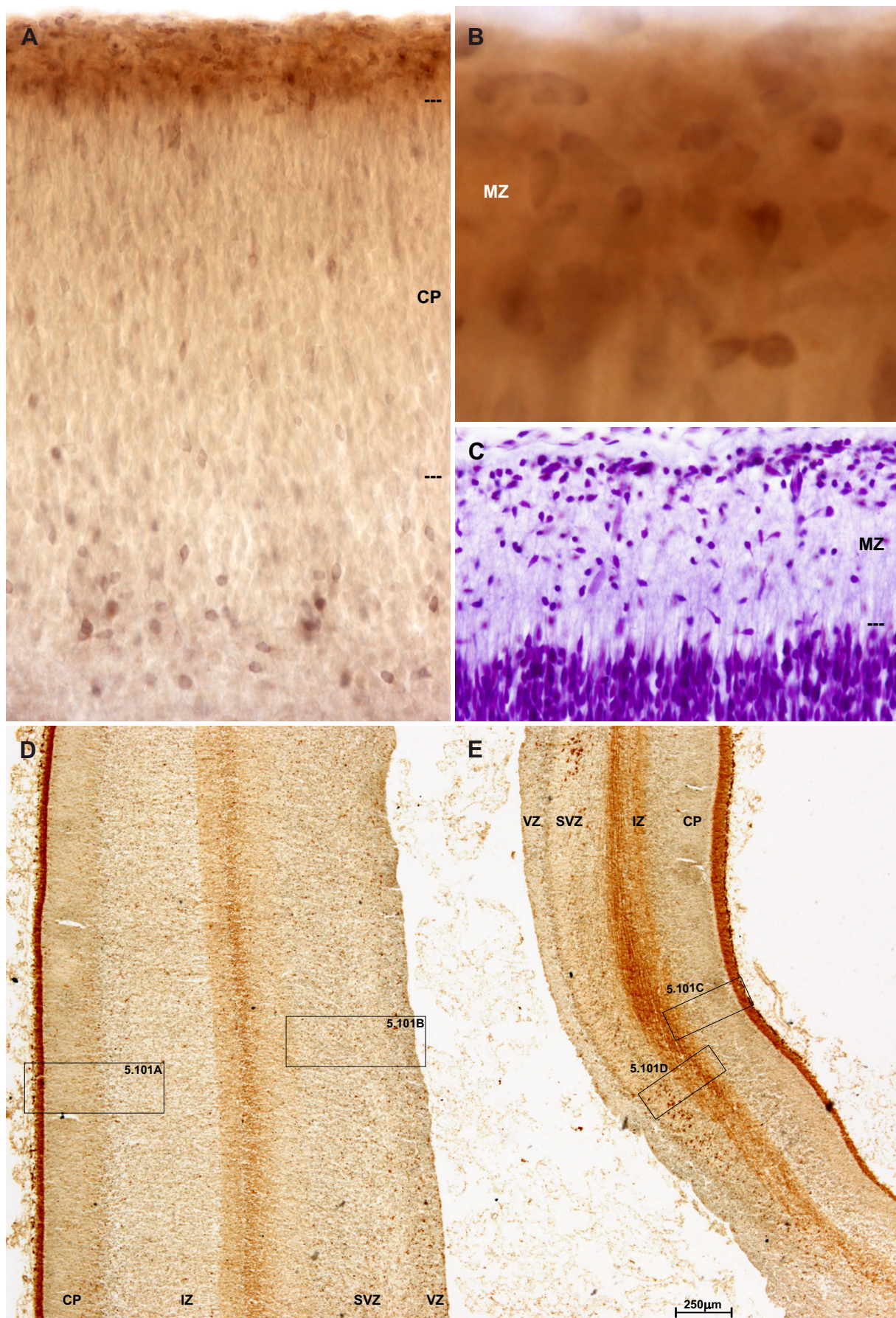
**Slika 5.99** Majmun E70, rezovi obojeni Nissl metodom (A-E) i E68, rez obrađen imunohistokemijski na Mash1 (F). Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli B-E.

**Slika 5.100** Majmun E68, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD67 (A, B) i kalretinin (D, E) i E70, rez obojen Nissl metodom (C). Pravokutnici označeni na panelu D uvećano su prikazani na slici 5.101A i B. Pravokutnici označeni na panelu E uvećano su prikazani na slici 5.101C i 5.101D.

Presjek prolazi kaudalnim dijelom telencefalona, budućim retrosplenijalnim područjem, osim na panelu C gdje prolazi rostralnim dijelom. Brojne male stanice marginalne zone pokazuju različite stupnjeve GAD67 ekspresije (A, B), kao i stanice ispod kondenziranog dijela kortikalne ploče (B). Orijentirane su u svim smjerovima, no više tangencijalno, a rijetko radijalno. Mali broj stanica kortikalne ploče pokazuje GAD67 ekspresiju te je ona uglavnom izrazito slaba. Ove stanice su radijalno orijentirane. GAD67 pozitivne stanice u marginalnoj zoni, kortikalnoj ploči i zoni ispod kortikalne ploče nemaju morfologiju stanica koje su započele diferencijaciju. Stoga ovi rezultati ukazuju kako su marginalna zona i zona ispod kortikalne ploče važan put migracije budućih GABA-ergičkih neurona koji tijekom migracije izražavaju GAD67. Kako marginalna zona u ovom stadiju pokazuje složeniju strukturu samo u kaudalnim dijelovima telencefalona (kakva će u preostalim dijelovima biti u kasnijem stadiju, slika 5.126 i 5.127), a u rostralnijim dijelovima nema mase malih stanica u sredini marginalne zone (C), može se pretpostaviti da je izvor ovih stanica u kaudalnim dijelovima telencefalona. GAD67 reaktivnost ne može se učiti u velikim subpijalno smještenim Cajal-Retziusovim stanicama koje čine kontinuirani sloj i pokazuju intenzivnu kalretininsku reaktivnost.

Brojne gusto posložene, male kalretininske stanice nalaze se cijelom širinom marginalne zone (uvećano na slici 5.101A i 5.101C), i u lateralnim neokortikalnim (D), i u mezo/arhi-kortikalnim dijelovima (E). U neokortikalnim dijelovima (D i slika 5.101A) distribucija malih kalretininskih stanica u marginalnoj zoni telencefaličkoga zida odgovara distribuciji GAD67 pozitivnih stanica. Na granici intermedijalne i subventrikularne zone neopalijuma (D) vidljiva je zona kalretininske reaktivnosti koja se od lateralne stijenke proteže u medijalnu, gdje je posebno intenzivna (E). U sredini medijalnog zida gusto su posložene visoko reaktivne kalretininske stanice koje pokazuju gradijent razrjeđenja prema ventralnim i dorzalnim dijelovima medijalnog zida te dalje prema lateralnom zidu. Iako je dojam da se radi o staničnoj reaktivnosti, nije isključeno da se ovdje radi i o reaktivnosti rastućih aksona.





**Slika 5.100** Majmun E68, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD67 (A, B) i kalretinin (D, E) i E70, rez obojen Nissl metodom (C). Pravokutnici označeni na panelu D uvećano su prikazani na slici 5.101A i B. Pravokutnici označeni na panelu E uvećano su prikazani na slici 5.101C i D.

**Slika 5.101** Majmun E68, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalretinin. Paneli A i B prikazuju uvećane dijelove označene pravokutnicima na slici 5.100D. Paneli C i D prikazuju uvećane dijelove označene pravokutnicima na slici 5.100E.

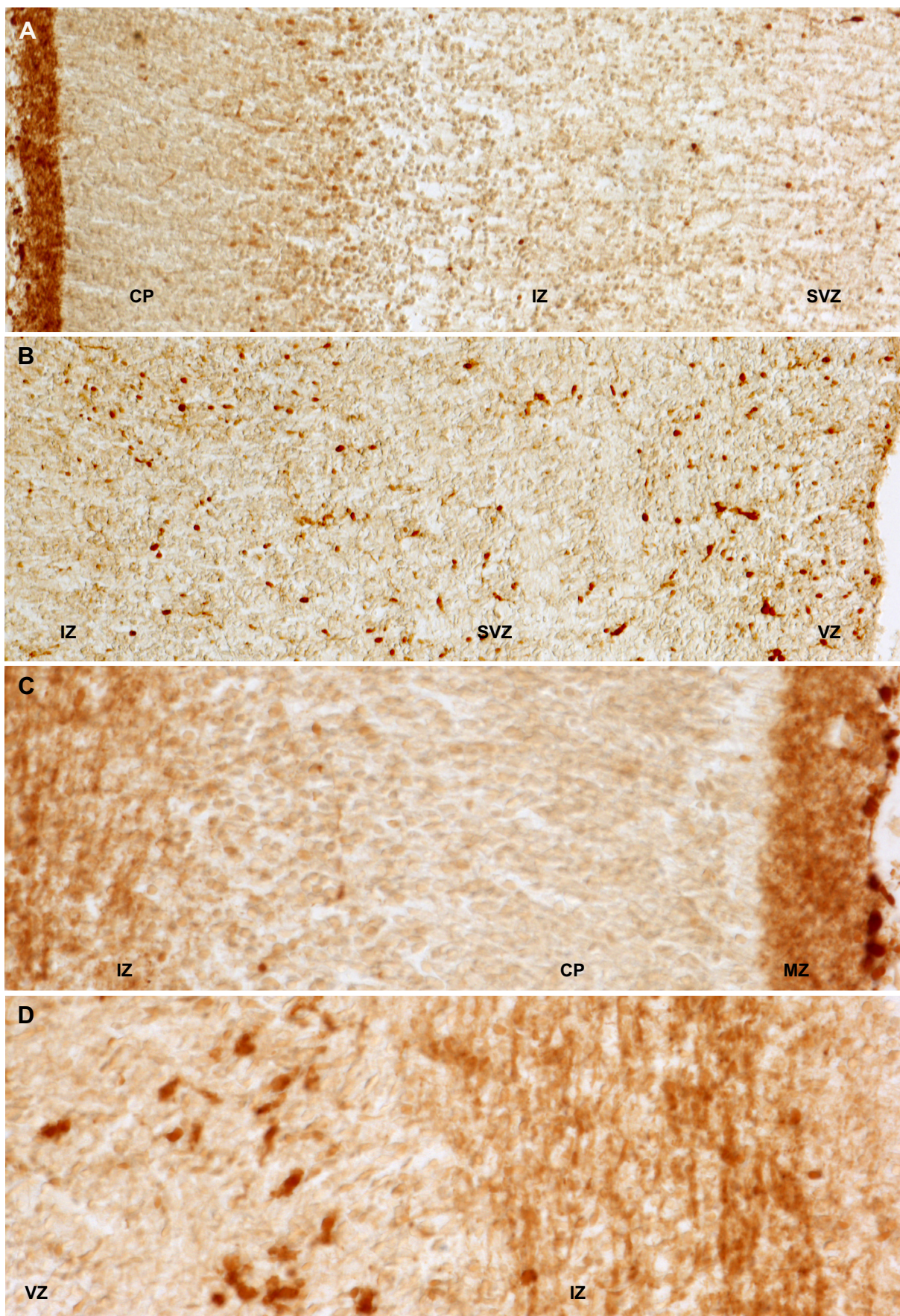
Uvećani dijelovi lateralnog telencefaličkog zida pokazuju da se u površnom dijelu zida (A) brojne kalretininske stanice nalaze u donjem dijelu kortikalne ploče koji se razrjeđuje (i čini zonu ispod kortikalne ploče), a posebno gusto poredane, reaktivne stanice prisutne su kroz cijelu marginalnu zonu, izuzev graničnog dijela prema kortikalnoj ploči. U marginalnoj zoni dominiraju velike, intenzivno reaktivne, subpijalno smještene, horizontalno orijentirane stanice koje čine kontinuirani sloj. Ostale male stanice marginalne zone nemaju ovako intenzivnu reaktivnost, već je reaktivnost bljeđa, ali jasno izražena kroz cijelo tijelo. Za razliku od toga, stanice neposredno ispod kortikalne ploče, koje veličinom odgovaraju malim stanicama marginalne zone, uglavnom pokazuju intenzivniju reaktivnost u dijelovima tijela. U proliferativnim zonama (B) nalaze se intenzivno reaktivne, male kalretininske stanice raspodijeljene u dvije zone približno jednake gustoće, u ventrikularnoj i vanjskom dijelu subventrikularne zone.

Oko sredine lateralne stijenke telencefalona vidi se zona kalretininske reaktivnosti koja je u kontinuitetu kroz cijeli telencefalon. Posebno je zadebljana u sredini medijalnog telencefaličkog zida (C) te se na većem povećanju može uočiti kako se radi o gusto zbijenim stanicama slične veličine i stupnja reaktivnosti kao i male stanice marginalne zone. Ova se zona stanjuje, a gustoća stanica se smanjuje prema ventralno i dorzalno (D) te zatim još više u lateralnom dijelu telencefalona. Ovo ukazuje kako se radi o putu migracije kalretininskih stanica iz medijalnih proliferativnih zona kaudalnog dijela telencefalona koji prolazi granicom intermedijalne i subventrikularne zone prema neopaljumu. Sličnost u morfologiji ovih stanica i malih stanica marginalne zone ukazuje na mogućnost da se radi o populaciji koja migrira kroz dva migratorna puta. Neposredno iznad središnjeg dijela proliferativne zone medijalnog telencefaličkog zida, nalazi se nakupina malih intenzivnije reaktivnih stanica (D) slične morfologije kao i kalretinin pozitivnih stanice u proliferativnim zonama lateralne stijenke. Također, u medijalnom telencefaličkom zidu (C) intenzivno reaktivne horizontalne Cajal-Retziusove stanice gušće su poredane nego lateralno (A), što ukazuje da je njihovo porijeklo iz medijalne stijenke kaudalnog dijela telencefalona.

**Slika 5.102** Majmun E68, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalretinin. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli B-D (lagano zakrivljeni u odnosu na poziciju na panelu A).

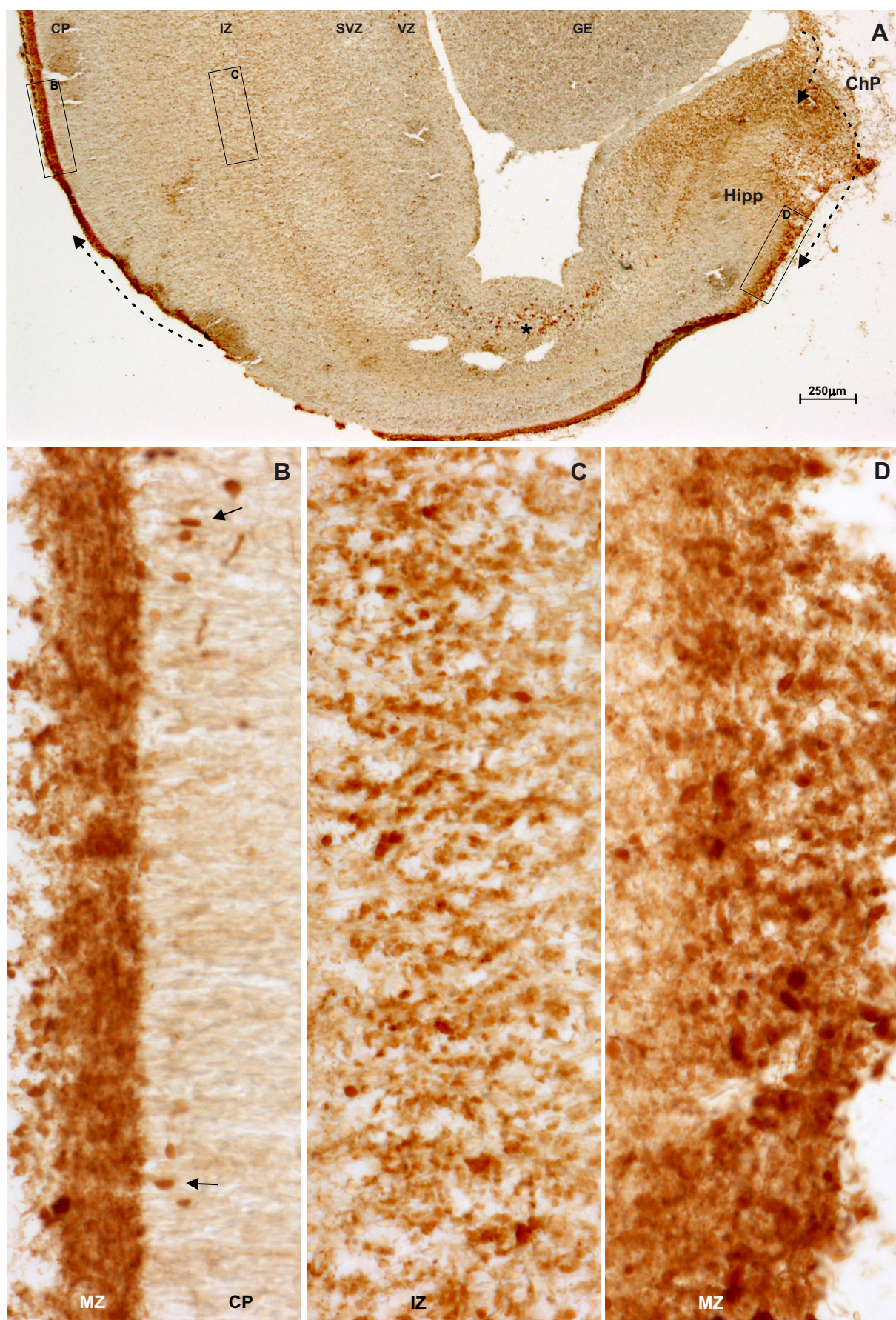
Presjek prolazi kroz rostralni dio hipokampusa (A). U medijalnim dijelovima hipokampusa, oko girus dentatusa i prema medijalnom zidu koji se spaja s koroidnim spletom, nalazi se masa gusto poredanih kalretinin pozitivnih stanica koje su usmjerene u





**Slika 5.101** Majmun E68, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalretinin. Paneli A i B prikazuju uvećane dijelove označene pravokutnicima na slici 5.100D. Paneli C i D prikazuju uvećane dijelove označene pravokutnicima na slici 5.100E.





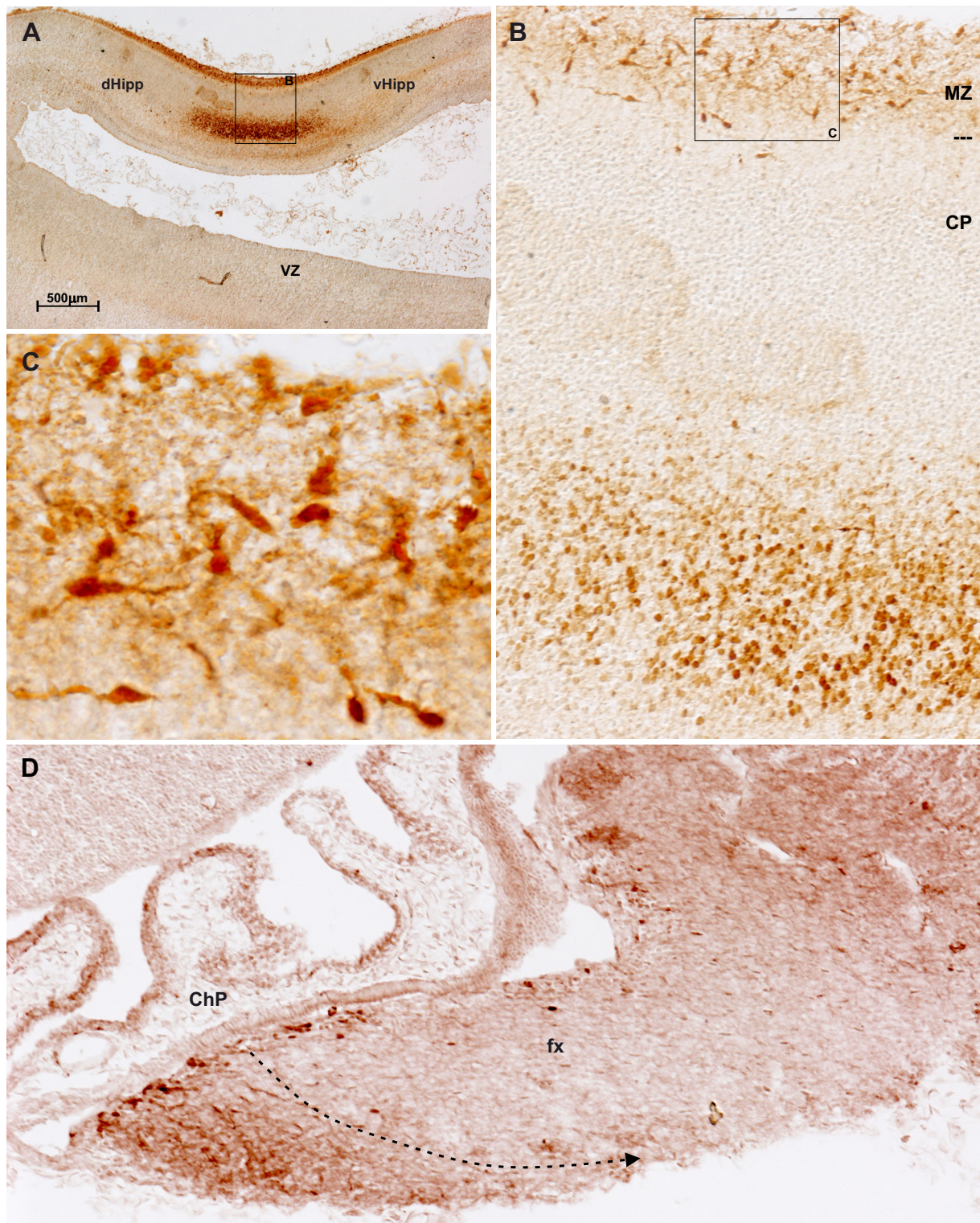
**Slika 5.102** Majmun E68, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalretinin. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli B-D.



marginalnu zonu. Stanice se nalaze izvan proliferativnih zona što ukazuje na njihovo porijeklo iz najmedijalnijih dijelova palijalnih proliferativnih zona telencefalona te migraciju prema marginalnoj zoni. Na to upućuje i gradijent smanjenja broja i gustoće stanica od medijalnog arhikortikalnog (D) do lateralnog neokortikalnog dijela telencefaličkog zida (B). Stanice istovjetne morfologije vidljive su i u sredini lateralne stijenke (C). Intenzivno reaktivne kalretininske stanice prisutne su i iznad ventrikularne zone mezokorteksa (zvjezdica, A), što može predstavljati kontinuitet sa stanicama slične laminarne pozicije opisanim u kaudalnim dijelovima medijalnog telencefaličkog zida (slike 5.100E i 5.101D). Na graničnom djelu marginalne zone i kortikalne ploče neokorteksa mogu se uočiti ravnomjerno poredane, kalretinin reaktivne, radijalno orijentirane stanice (strelice, B).

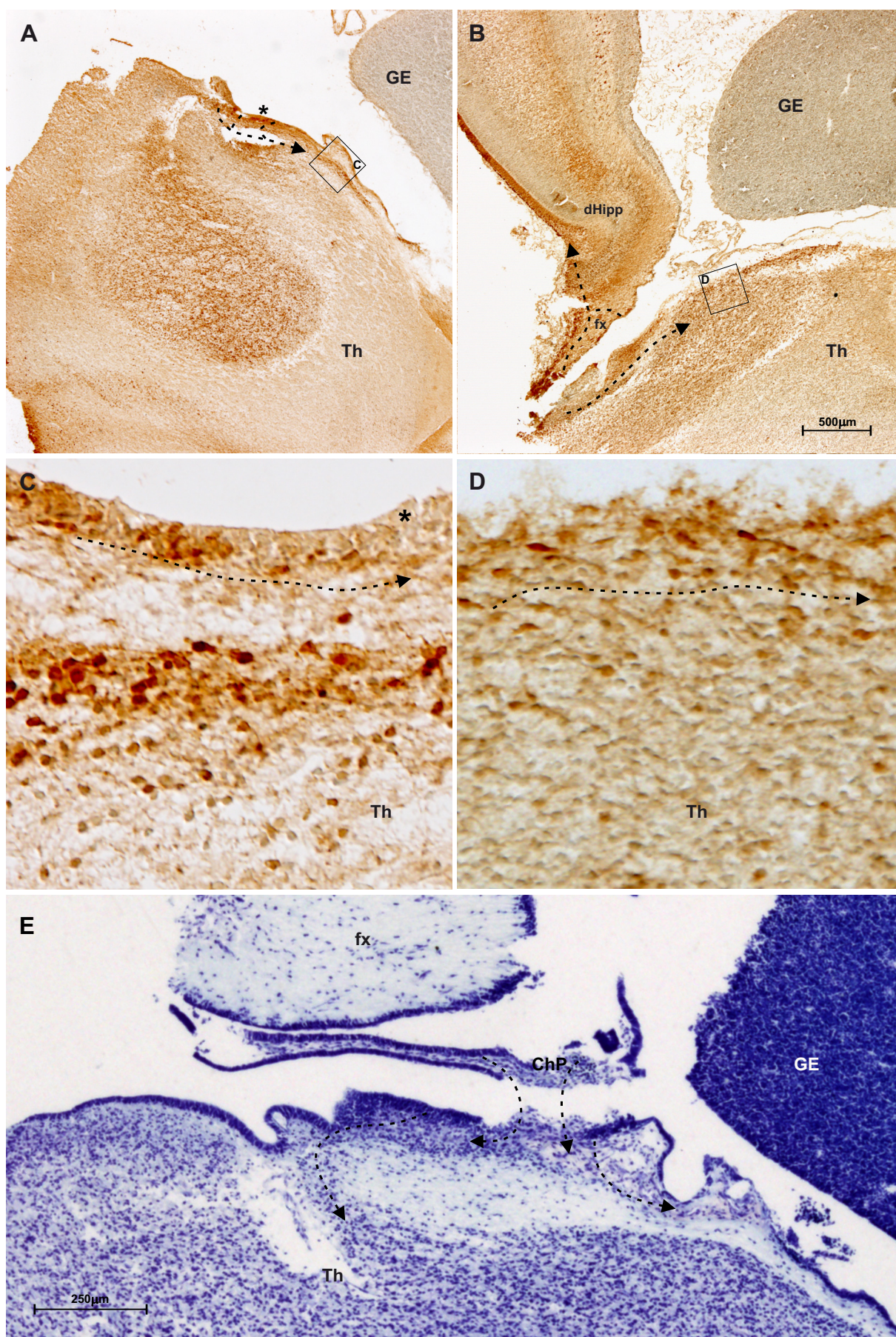
**Slika 5.103** Majmun E68, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalbindin. Pravokutnik označen na panelu A uvećano je prikazan kao panel B. Pravokutnik označen na panelu B uvećano je prikazan kao panel C.

Panel A prikazuje presjek u razini kaudalnog dijela telencefalona, prijelaz dorzalnog u ventralni hipokampus, dok panel D prikazuje nešto rostralniji presjek. Kalbindinska reaktivnost u medijalnom telencefaličkom zidu (A) prisutna je u dva sloja. Prvi sloj čine gusto grupirane, male okrugle stanice u središnjem dijelu stijenke (B) te se najvjerojatnije radi o budućim znatim neuronima girus dentatusa koji u zrelom mozgu izražavaju kalbindin. Drugi sloj proteže se kroz cijelu marginalnu zonu te je posebno zadebljan u sredini medijalnog telencefaličkog zida (B). Stanice ovog sloja imaju unipolarnu morfologiju (C) i najvjerojatnije se radi o migrirajućim Cajal-Retziusovim stanicama koje će se gusto poredati subpijalno kroz cijelu telencefaličku marginalnu zonu. Kako su u ovom dijelu stanice izrazito guste i raspoređene kroz cijelu marginalnu zonu, može se zaključiti kako su palijalne proliferativne zone kaudalnih dijelova telencefalona izvor ovih stanica. U proliferativnim zonama nema kalbindinske reaktivnosti, izuzev u proliferativnoj zoni forniksa na granici prema koroidnom spletu (D). Kalbindin reaktivne stanice usmjerene su prema površini forniksa, što ukazuje kako je upravo ovaj dio proliferativne zone izvor Cajal-Retziusovih stanica.



**Slika 5.103** Majmun E68, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalbindin. Pravokutnik označen na panelu A uvećano je prikazan kao panel B. Pravokutnik označen na panelu B uvećano je prikazan kao panel C.





**Slika 5.104** Majmun E68, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalbindin (A, C) i kalretinin (B, D) te rez obrađen Nissl metodom (E). Pravokutnik označen na panelu A uvećano je prikazan kao panel C. Pravokutnik označen na panelu B uvećano je prikazan kao panel D.

**Slika 5.104** Majmun E68, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalbindin (A, C) i kalretinin (B, D) te rez obrađen Nissl metodom (E). Pravokutnik označen na panelu A uvećano je prikazan kao panel C. Pravokutnik označen na panelu B uvećano je prikazan kao panel D.

Koronalni presjek prolazi središnjim dijelom talamusa. U dorzalnog dijelu talamusa (A, B) vidljiva je kalbindinska (C) i kalretininska (D) reaktivnost u stanicama proliferativnih zona koje pripadaju stanjenom dijelu medijalnog telencefaličkog zida (zvjezdica, A i C) koji je prirastao uz talamus. Na Nissl preparatu (E) vidljivo je nakupljanje stanica u dorzalnog dijelu talamusa na spoju s koroidnim spletom. Ova nakupina stanica nastavak je stanica koje dolaze iz stanjenog dijela medijalnog telencefaličkog zida (zvjezdica, A i C) koji spaja dorzalni talamus sa komisuralnom pločom (forniks i korpus kalozum). Ovi podaci ukazuju kako stanice medijalnog telencefaličkog zida, koje se stvaraju na spoju prema koroidnom spletu i u proksimalnom dijelu samog koroidnog spleta, ne migriraju samo prema telencefalonu, već i u dorzalni dio talamusa.

**Slika 5.105** Majmun E64, rez obrađen imunohistokemijski na GAD65.

U gornjoj polovici lateralne stijenke telencefalona nalaze se brojni tangencijalno i neradijalno orijentirani nastavci koji većinom odgovaraju vodećem nastavku migratornih stanica. Nastavci su posebno gusto poredani kroz veći dio marginalne zone, izuzev subprijalnog dijela i granice prema kortikalnoj ploči. U ovoj zoni nije moguće razaznati u kojoj mjeri u reaktivnosti ove mreže sudjeluju i aksoni, s obzirom da je ovaj dio marginalne zone ispunjen horizontalnim vlaknima. Iako se i unutar kortikalne ploče mogu zamijetiti brojni horizontalno orijentirani nastavci, ipak je u donjem dijelu i ispod same kortikalne ploče njihova gustoća veća. U preostalom dijelu stijenke se također nalaze brojni nastavci koji su gušće poredani prema ventrikularnoj površini. U intermedijalnoj zoni nema dominacije tangencijalno orijentiranih nastavaka, već su nastavci orijentirani u svim smjerovima. Ovo ukazuje kako su marginalna zona i sloj neposredno ispod kortikalne ploče mjesta glavnih tangencijalnih migratornih puteva (engl. *stream*), dok kroz intermedijalnu zonu migriraju stanice koje se odvajaju od tangencijalno migrirajućeg snopa koji prolazi gornjim dijelom vanjske subventrikularne zone ili se radi o budućim GABA-ergičkim neuronima koji se stvaraju u palijalnim proliferativnim zonama.





**Slika 5.105** Majmun E64, rez obrađen imunohistokemijski na GAD65.

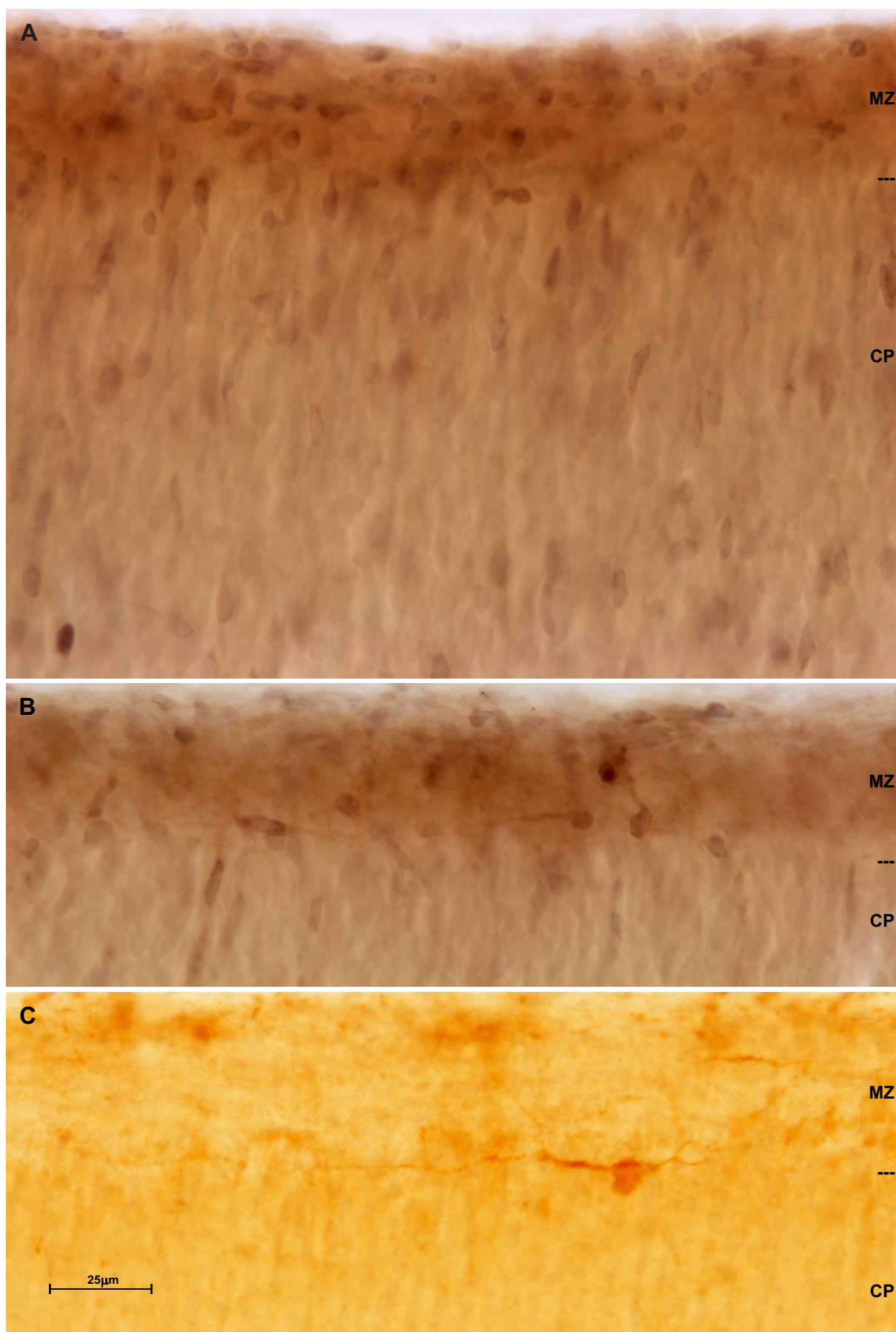
**Slika 5.106** Majmun E68, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD67 (A, B) i somatostatin (C).

Panel A odgovara presjeku u kaudalnom dijelu telencefalona i prikazuje dio medijalnog telencefaličkog zida. U marginalnoj zoni nalaze se brojne male GAD67 pozitivne stanice, uglavnom tangencijalno orijentirane, bez znakova diferencijacije. Kroz kortikalnu ploču, više u njenom površnom dijelu, nalaze se male, radijalno orijentirane stanice također bez znakova diferencijacije. Ovakav obrazac ukazuje na mogućnost da GAD67 pozitivne stanice migriraju kroz kortikalnu ploču prema marginalnoj zoni gdje dalje tangencijalno migriraju. U prilog migraciji budućih GABA-ergičkih neurona koji potječu iz medijalnog zida i migriraju kroz kortikalnu ploču prema neokortikalnim dijelovima telencefalona ukazuje i manja gustoća malih GAD67 pozitivnih stanica u lateralnoj stijenci (B). U lateralnim dijelovima telencefalona, na granici marginalne zone s kortikalnom pločom (B), mogu se uočiti veći, dijelom diferencirani neuroni. Većinom su horizontalno orijentirani, ali se kod nekih dendriti granaju kroz marginalnu zonu. Ovdje se mogu zamijetiti i pojedine kalretinin (slika 5.102B) i kalbindin (slika 5.107A) pozitivne stanice koje započinju s diferencijacijom. Morfološki najbližnje velikim GAD67 pozitivnim stanicama na granici marginalne zone i kortikalne ploče su somatostatin pozitivne stanice (C, slika 5.108B, D-G). GAD67 reaktivnost nije vidljiva u velikim subprijalno smještenim Cajal-Retziusovim stanicama.

**Slika 5.107** Majmun E64, rez obrađen imunohistokemijski na kalbindin te dodatno obrađen Nissl metodom (A) i rez obrađen imunohistokemijski na GAD65 (B).

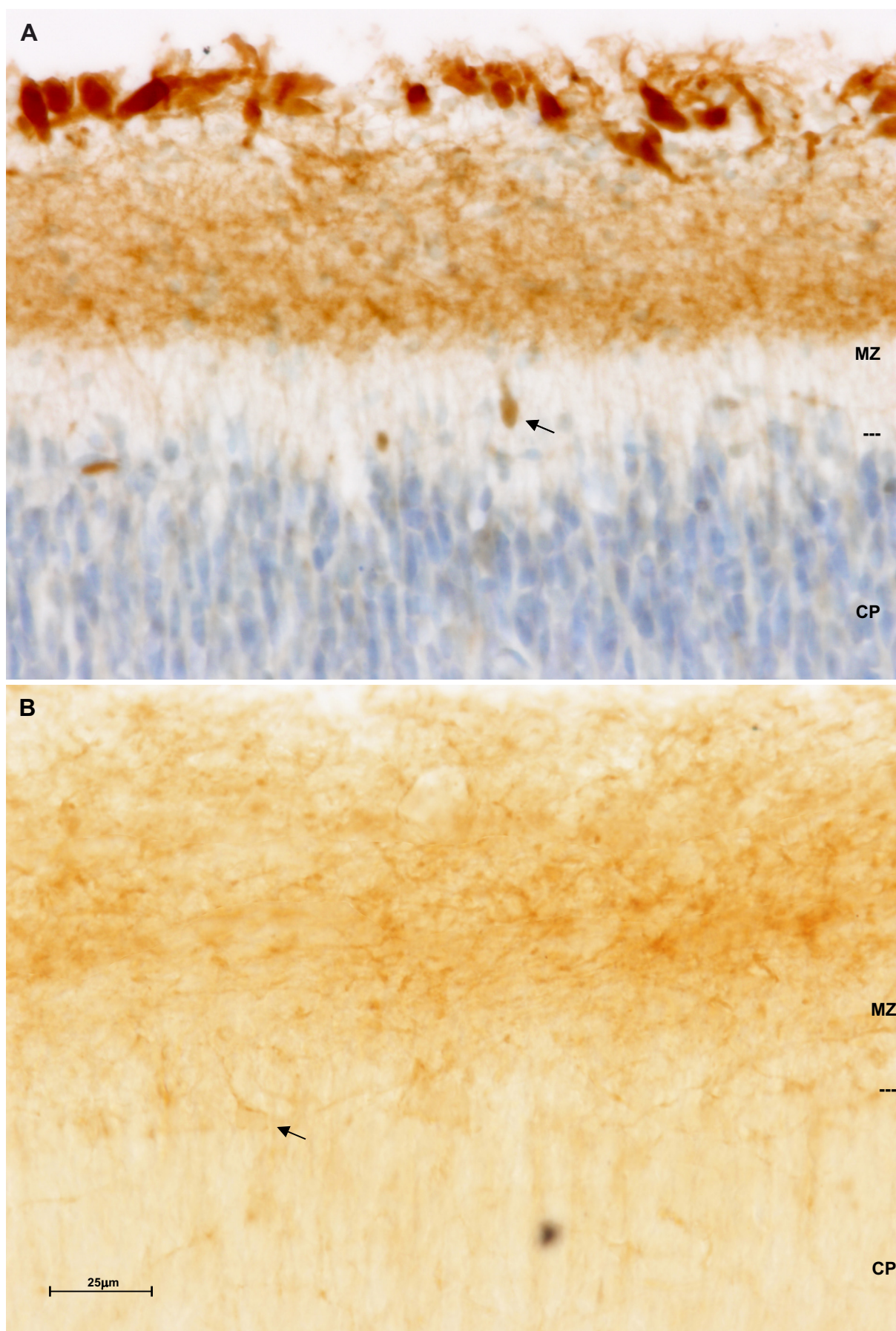
Paneli prikazuju strukturu marginalne zone. Velike subprijalno smještene, horizontalno orijentirane i gusto poredane stanice intenzivno su kalbindin reaktivne (A). U sredini marginalne zone vidljiva je gusta mreža vlakana koja pokazuje gradijent povećanja gustoće od pije prema ventrikularnoj površini. Obrazac jasno odgovara aksonskom bojenju, ali reaktivnost je prisutna i u tijelu pojedinih stanica, iako ne tako jasno izražena kao na kalretininskim i GAD67 rezovima (slike 5.101 i 5.106). Sličan obrazac bojenja vidljiv je i na GAD65 obrađenim rezovima (B), no jasnije je izražena reaktivnost u tijelu stanica i vodećem nastavku. Na granici marginalne zone i kortikalne ploče vidljive su kalbindin i GAD65 reaktivne stanice koje su započele s procesom diferencijacije (strelica A i B).





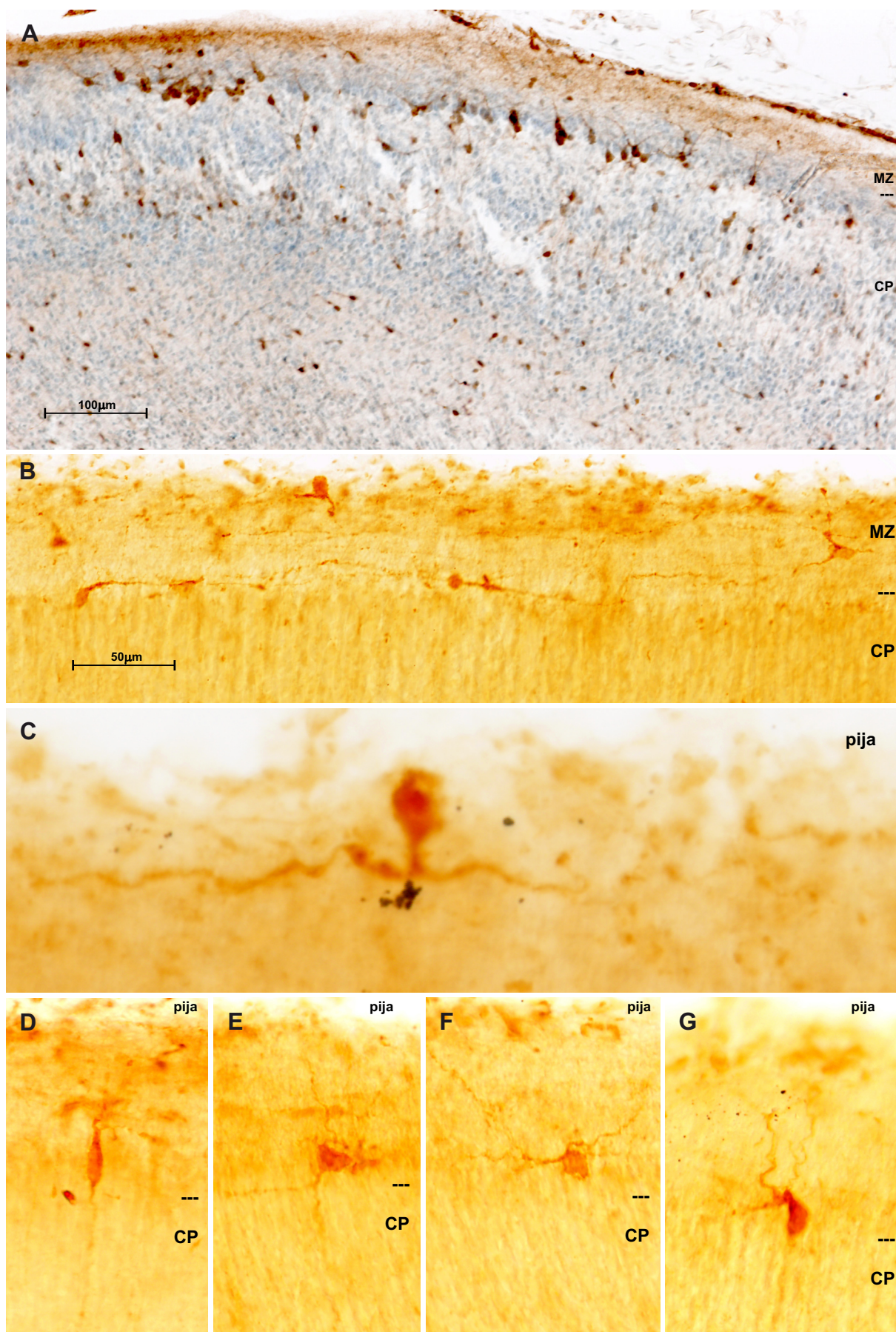
**Slika 5.106** Majmun E68, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD67 (A, B) i somatostatin (C).





**Slika 5.107** Majmun E64, rez obrađen imunohistokemijski na kalbindin te dodatno obrađen Nissl metodom (A) i rez obrađen imunohistokemijski na GAD65 (B).





**Slika 5.108** Majmun E64, rez obrađen imunohistokemijski na kalbindin te dodatno obojen Nissl metodom (A) i rezovi obrađeni imunohistokemijski na somatostatin (B-G).

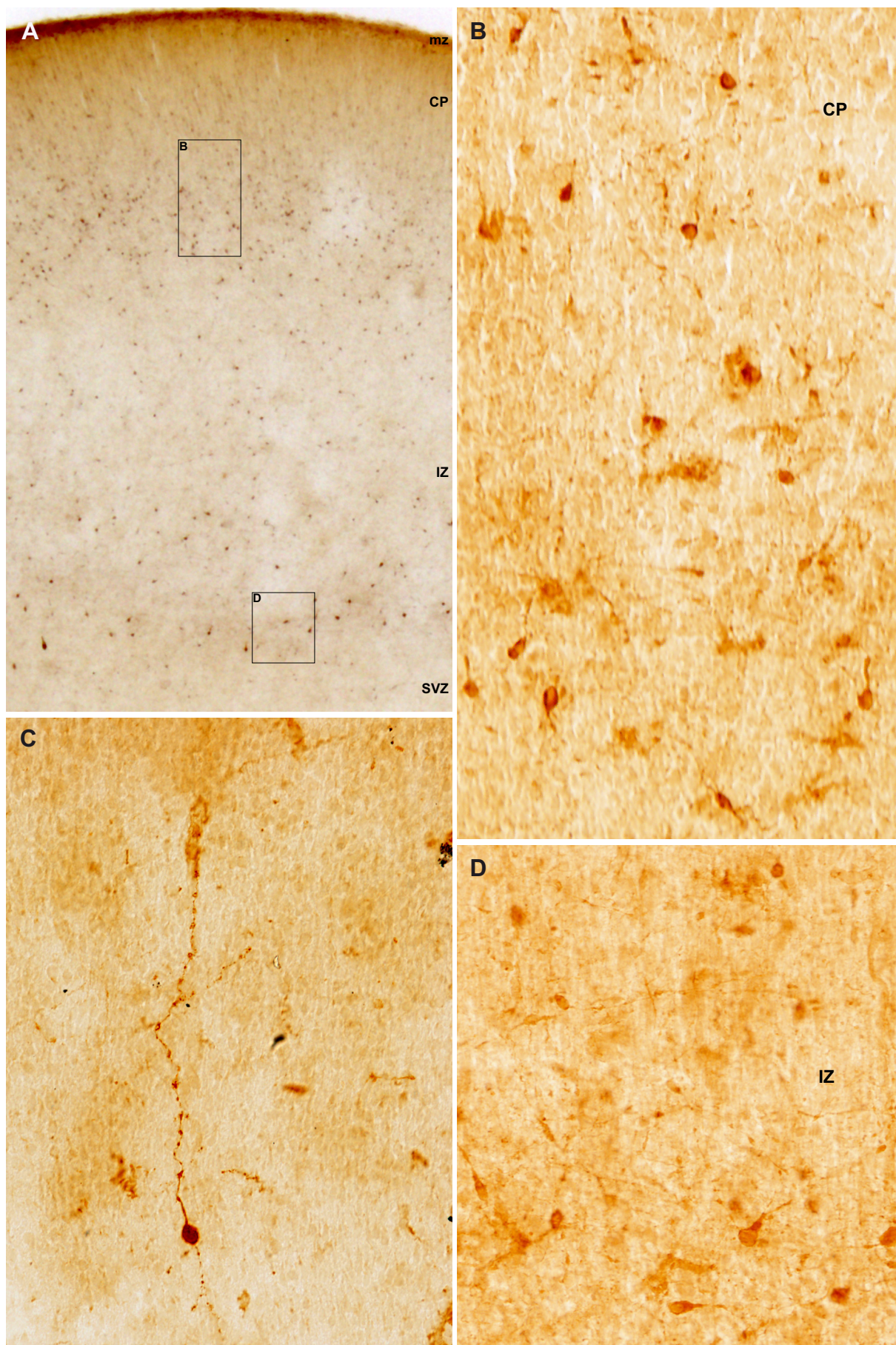
**Slika 5.108** Majmun E64, rez obrađen imunohistokemijski na kalbindin te dodatno obojen Nissl metodom (A) i rezovi obrađeni imunohistokemijski na somatostatin (B-G).

Panel A prikazuje entorinalno područje, a panel B neokorteks. U entorinalnom području (A) u površnom dijelu kortikalne ploče vidljivi su brojni, dobro diferencirani, veliki kalbindin pozitivni neuroni grupirani u otočiće. U neokortikalnim dijelovima na granici kortikalne ploče i marginalne zone sporadično se nalaze kalbindin pozitivne stanice (slika 5.107A) koje su započele s diferencijacijom, ali nisu tako velike i diferencirane kao neuroni u entorinalnom području. Daleko brojnije stanice u neokortikalnim dijelovima su somatostatinske stanice koje su u pravilnom nizu (B) smještene na granici marginalne zone i kortikalne ploče (D-G). No, somatostatinske stanice mogu se sporadično zapaziti i subpijalno (C), kao i kroz cijelu širinu marginalne zone. Ove stanice nemaju horizontalnu bipolarnu morfologiju kao Cajal-Retziusove stanice. Obilježje somatostatin reaktivnih, diferenciranih stanica na granici marginalne zone i kortikalne ploče (D-G) je dendritičko razgranjenje kroz marginalnu zonu uz akson usmjeren prema dubini u kortikalnu ploču. Ovi podaci ukazuju da se u graničnom dijelu marginalne zone i kortikalne ploče nalaze dobro diferencirani i funkcionalni GABA-ergički neuroni.

**Slika 5.109** Majmun E68, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD67 (A, B, D) i na somatostatin (C). Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli B i D.

Paneli prikazuju neokortikalne dijelove telencefalona. Intenzivno reaktivne GAD67 stanice koje su započele s diferencijacijom poredane su u dva sloja. Deblji sloj nalazi se ispod kortikalne ploče te odgovara širini same kortikalne ploče (B). Drugi sloj je smješten dublje, na samom dnu intermedijalne zone (D), ali se stanice sporadično vide i kroz cijelu intermedijalnu zonu. Iako se sporadično mogu naći i multipolarne stanice, ove stanice su uglavnom jednostavnije piriformne ili bipolarne morfologije. Na granici kortikalne ploče i sloja ispod kortikalne ploče mogu se uočiti i brojne intenzivno reaktivne, somatostatinske, bipolarne, radijalno orijentirane stanice s dugačkim nastavcima (C). Ovi podaci pokazuju da se ispod kortikalne ploče, izvan osnove budućih kortikalnih slojeva, nalazi bogata GABA-ergička neuralna mreža.





**Slika 5.109** Majmun E68, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD67 (A, B, D) i somatostatin (C). Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli B i D.

### **5.3 STADIJ III U MAJUMUNA (E70-E90) I ČOVJEKA (15-17PCW): SREDNJE FETALNO RAZDOBLJE**

#### **5.3.1 Tangencijalna migracija u čovjeka između 15. i 17. tjedana nakon začeća**

Kod čovjeka je u srednjem fetalnom razdoblju (15-17PCW) došlo do daljnje diferencijacije telencefalona. Korpus kalozum i forniks su jasno razvijeni (slika 5.110A i 5.110B), a masivan snop urastajućih talmokortikalnih i izrastajućih kortikofugalnih aksona oblikuje kapsulu internu (slika 5.110C). Svi dijelovi hipokampusa jasno su razvijeni (slika 5.110D). U odnosu na prethodni stadij, najveća razlika u citoarhitektici je jasna delineacija vanjske subventrikularne zone, pogotovo u dorzalnog dijelu telencefalona (slika 5.110A, 5.111A i 5.111B). Zanimljivo je kako se upravo u ovoj zoni može zapaziti najviše migratornih stanica. Većina stanica u vanjskoj subventrikularnoj zoni su unipolarne stanice s jednim kratkim nastavkom što je tipično za tangencijalno migrirajuće stanice, no većina stanica u ovom dijelu telencefalona je više radijalno orijentirana. To ukazuje na pretpostavku kako se značajan dio GABA-ergičkih neurona stvara tijekom ovog razdoblja u dorzalnim proliferativnim zonama, ili glutamatergičke stanice koje se stvaraju u vanjskoj subventrikularnoj zoni nemaju bipolarnu morfologiju i ne putuju uz radijalnu gliju. I u ovom razdoblju masa gusto poredanih unipolarnih tangencijalno migrirajućih stanica napušta ganglijski brežuljak (slika 5.111C), kao i u prethodnim stadijima. Za razliku od ranijih stadija, u vrhu temporalnog režnja koji je sada dobro razvijen (slika 5.111D), vidljive su gusto poredane, unipolarne migratorne stanice koje napuštaju temporalnu proliferativnu zonu (slika 112).

Uz ganglijski brežuljak, proliferativnu zonu u vrhu temporalnog režnja i vanjsku subventrikularnu zonu, masa unipolarnih migratornih stanica vidljiva je u dorzalnog dijelu medijalnog telencefaličkog zida (slika 5.113). Ove stanice su jednim velikim dijelom orijentirane radijalno prema površini, a jednim dijelom su koso usmjerene i iznad korpus kalozuma idu ventralno prema sredini površine medijalnog telencefaličkog zida. Kako u ovom dijelu nema kortikalne ploče, moguće je da se radi o stanicama koje će nakon što dođu do pijalne površine tangencijalno migrirati kroz marginalnu zonu.



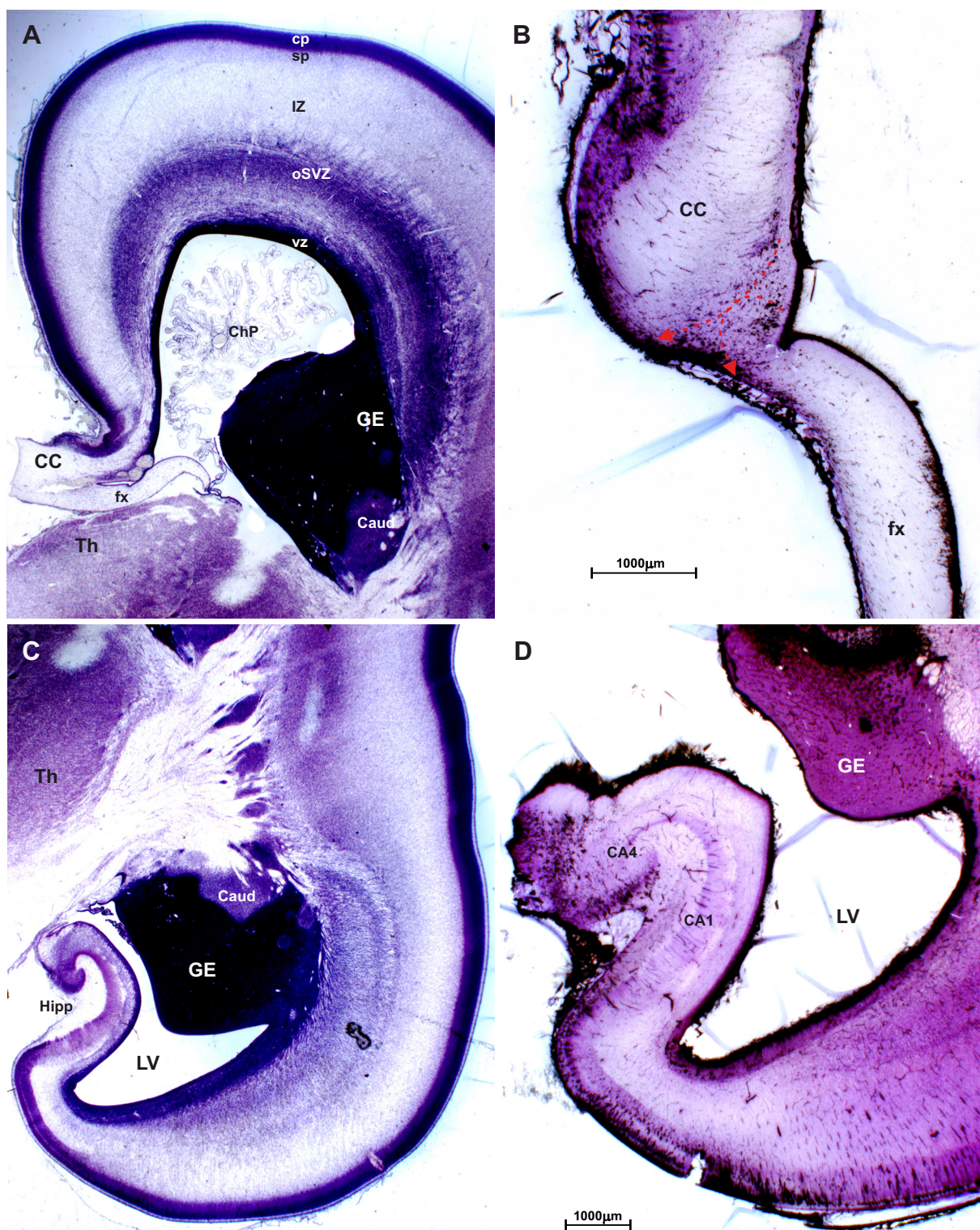
## Deskriptivna analiza Nissl i Golgi rezova

**Slika 5.110** Fetus čovjeka star 15 tjedana, rezovi obojeni Nissl metodom (A, C) i 17 tjedana, Golgi impregnirani rezovi dodatno obojeni Nissl metodom (B, D).

U ovom stadiju korpus kalozum i forniks su jasno razvijeni (A, B), a masivan snop urastajućih talmokortikalnih i izrastajućih kortikofugalnih aksona oblikuje kapsulu internu (C). Zbog rasta kalozalnih aksona u dorzalnog dijelu hemisfere jasno se razlikuju vanjska i unutarnja subventrikularna zona (A). Svi dijelovi hipokampusa jasno su razvijeni (C, D). Obrazac bojenja ventrikularne zone palijuma jednak je obrascu bojenja ganglijskog brežuljka (A, C), što ukazuje na slična svojstva progenitora u ove dvije zone. Iako je obrazac bojenja unutarnje i vanjske subventrikularne zone istovjetan, drukčiji je od obrasca ventrikularne zone i ganglijskog brežuljka gdje su stanice puno gušće poredane. Ispod korpusa kalozuma i iznad forniksa migratorne stanice usmjerene su od subkalozalnog diejla proliferativne zone prema površini medijalnog telencefaličkog zida (isprekidane strelice, B).

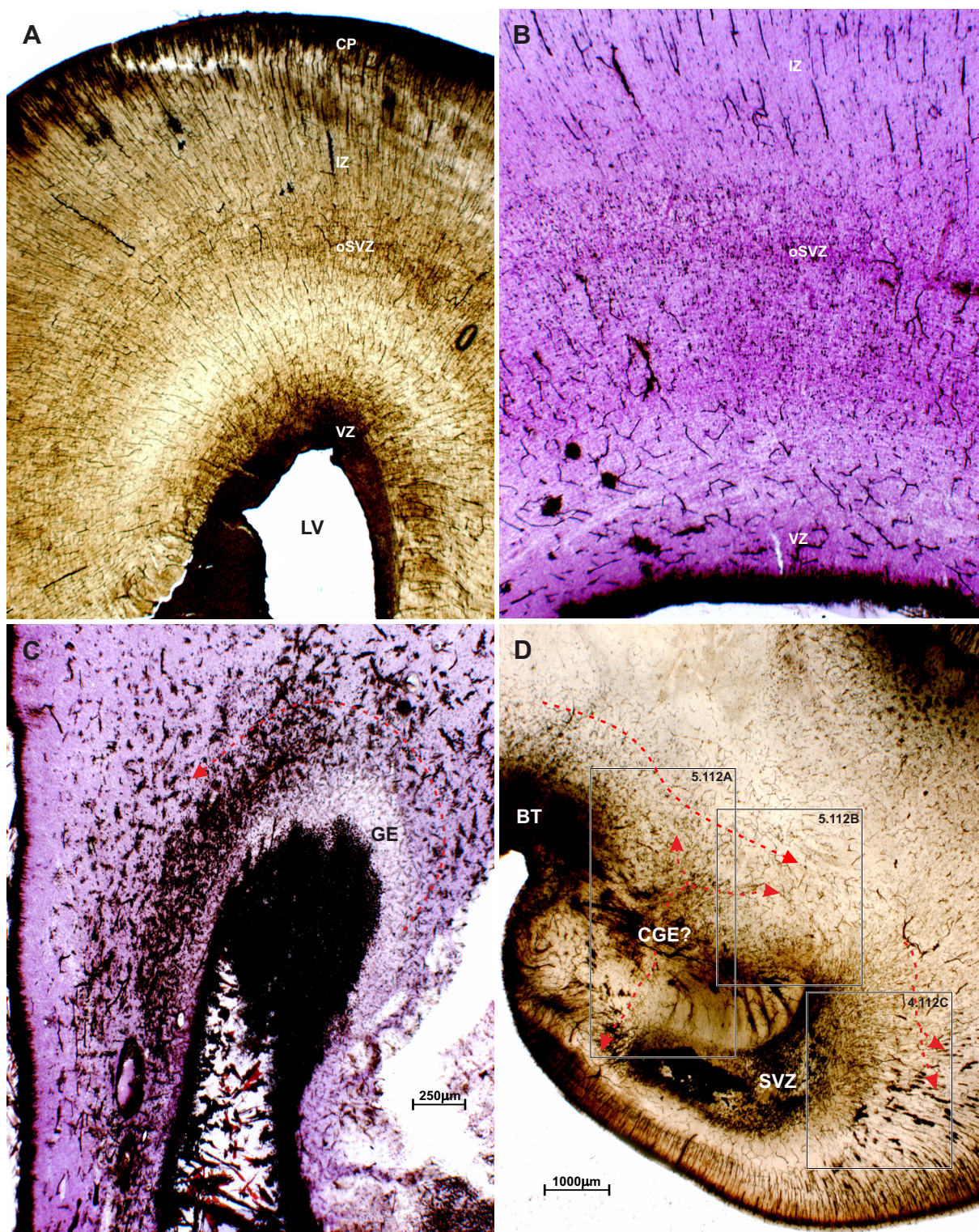
**Slika 5.111** Fetus čovjeka star 17 tjedana, Golgi impregnirani rezovi (A,D) dodatno obojeni Nissl metodom (B, C). Pravokutnici označeni na panelu D uvećano su prikazani kao slika 5.112A-C.

Najviše migratornih stanica može se zapaziti u vanjskoj subventrikularnoj zoni, a ne u zoni urastanja vlakana neposredno ispod vanjske subventrikularne zone (A, B). Većina stanica u vanjskoj subventrikularnoj zoni su unipolarne stanice s jednim kratkim nastavkom što je tipično za tangencijalno migrirajuće stanice, no većina stanica u ovom dijelu telencefalona radijalno je orijentirana. To ukazuje na pretpostavku kako se značajan dio GABA-ergičkih neurona stvara tijekom ovog razdoblja u dorzalnim proliferativnim zonama, ili glutamatergičke stanice koje se stvaraju u vanjskoj subventrikularnoj zoni nemaju bipolarnu morfologiju i ne putuju uz radijalnu gliju. Gusto poredan snop unipolarnih tangencijalno migrirajućih stanica napušta ganglijski brežuljak (isprekidna strelica, C), kao i u prethodnim stadijima. Za razliku od ranijih stadija, u vrhu temporalnog režnja koji je sada dobro razvijen (D), vidljive su gusto poredane, unipolarne migratorne stanice koje napuštaju temporalnu proliferativnu zonu. Na osnovi orijentacije stanica, crvenim strelicama su prikazani mogući smjerovi tangencijalne migracije (uvećan prikaz na slici 5.112).



**Slika 5.110** Fetus čovjeka star 15 tjedana, rezovi obojeni Nissl metodom (A, C) i 17 tjedana, Golgi impregnirani rezovi dodatno obojeni Nissl metodom (B, D).





**Slika 5.111** Fetus čovjeka star 17 tjedana, Golgi impregnirani rezovi (A,D) dodatno obojeni Nissl metodom (B, C). Pravokutnici označeni na panelu D uvećano su prikazani kao slika 5.112A-5.112C.

**Slika 5.112** Fetus čovjeka star 17 tjedana, Golgi impregnirani rezovi. Paneli A-C prikazuju područja označena pravokutnicima na slici 5.111D. Pravokutnik označen na panelu A uvećano je prikazan kao panel D, pravokutnik označen na panelu C uvećano je prikazan kao panel E.

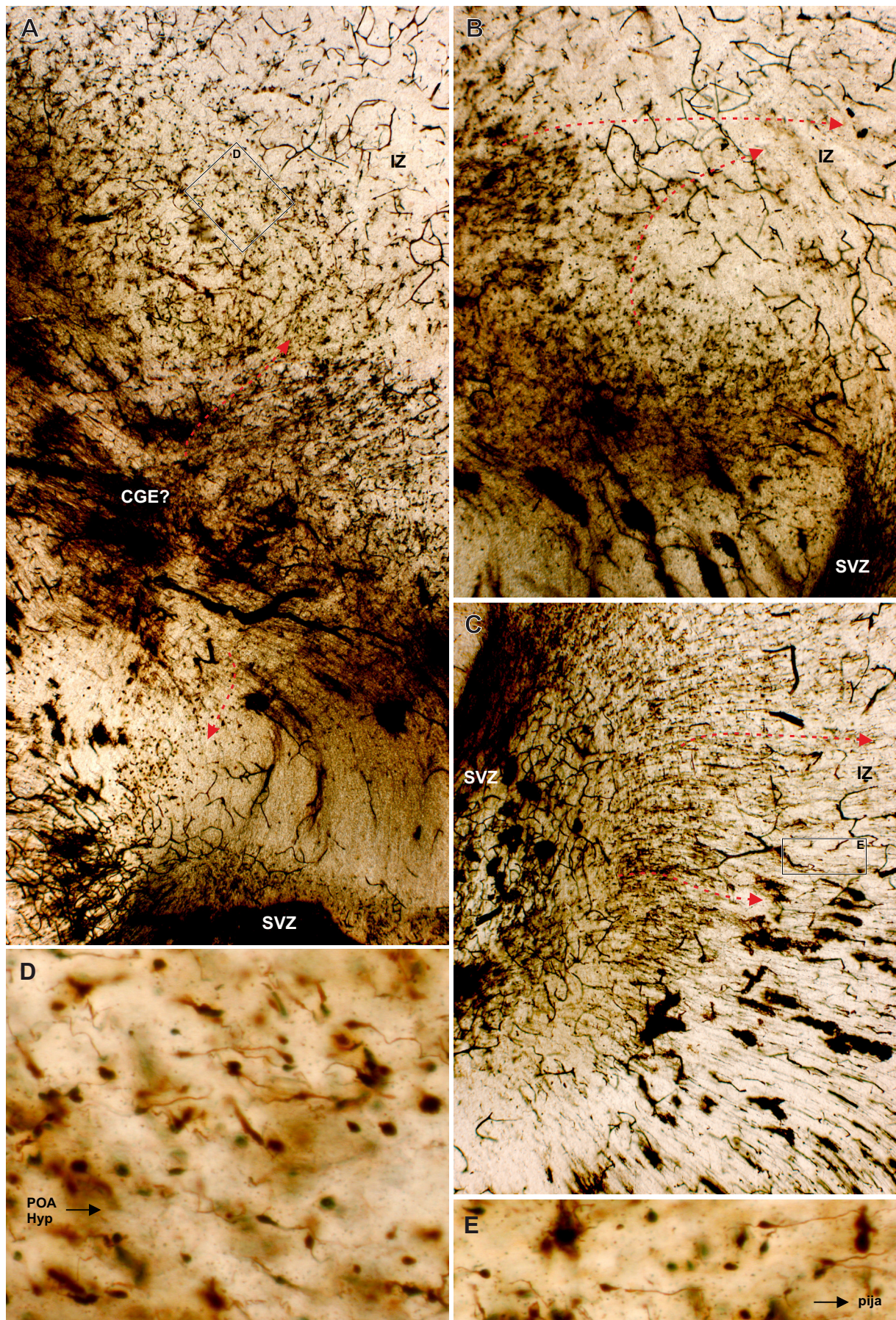
Iz medijalnih dijelova proliferativne zone, rostralno od vrha temporalnog roga lateralne klijetke, prema dorzalno i prema ventralno povećava se broj impregniranih unipolarnih migratornih stanica (A). Njihovo grupiranje vidljivo je u dorzolateralnim dijelovima (B), dok u lateralnim dijelovima (C) prevladavaju radijalno orijentirane stanice (E). U području koje se proteže prema bazalnom telencefalonu vidljive su brojne tangencijalno orijentirane stanice koje ukazuju na moguću migraciju iz smjera preoptičkog područja i hipotalmusa (D, isprekidane strelice na slici 5.111D).

**Slika 5.113** Fetus čovjeka star 17 tjedana, Golgi impregnirani rezovi (A, B) dodatno obojeni Nissl metodom (C, D). Pravokutnik označen na panelu A uvećano je prikazan kao panel B. Pravokutnik označen na panelu C uvećano je prikazan kao panel D.

Panel A prikazuje dorzalni dio medijalnog telencefaličkog zida, presjek koji prolazi ispred rostralnog dijela korpus kalozuma. Iz dorzo-rostralnog dijela medijalnog telencefaličkog zida masa unipolarnih stanica odlazi iz proliferativnih zona. Ove stanice su jednim velikim dijelom orijentirane radijalno prema površini (panel B rotiran za 90° u smjeru kazaljke na satu), a jednim dijelom su koso usmjerene i iznad korpus kalozuma idu ventralno prema sredini površine medijalnog telencefaličkog zida. Stanice koje radijalno migriraju (B) u ovom području imaju tipičnu unipolarnu morfologiju karakterističnu za tangencijalno migrirajuće stanice. Kako u ovom dijelu nema kortikalne ploče, moguće je da se radi o stanicama koje će tangencijalno migrirati kroz marginalnu zonu.

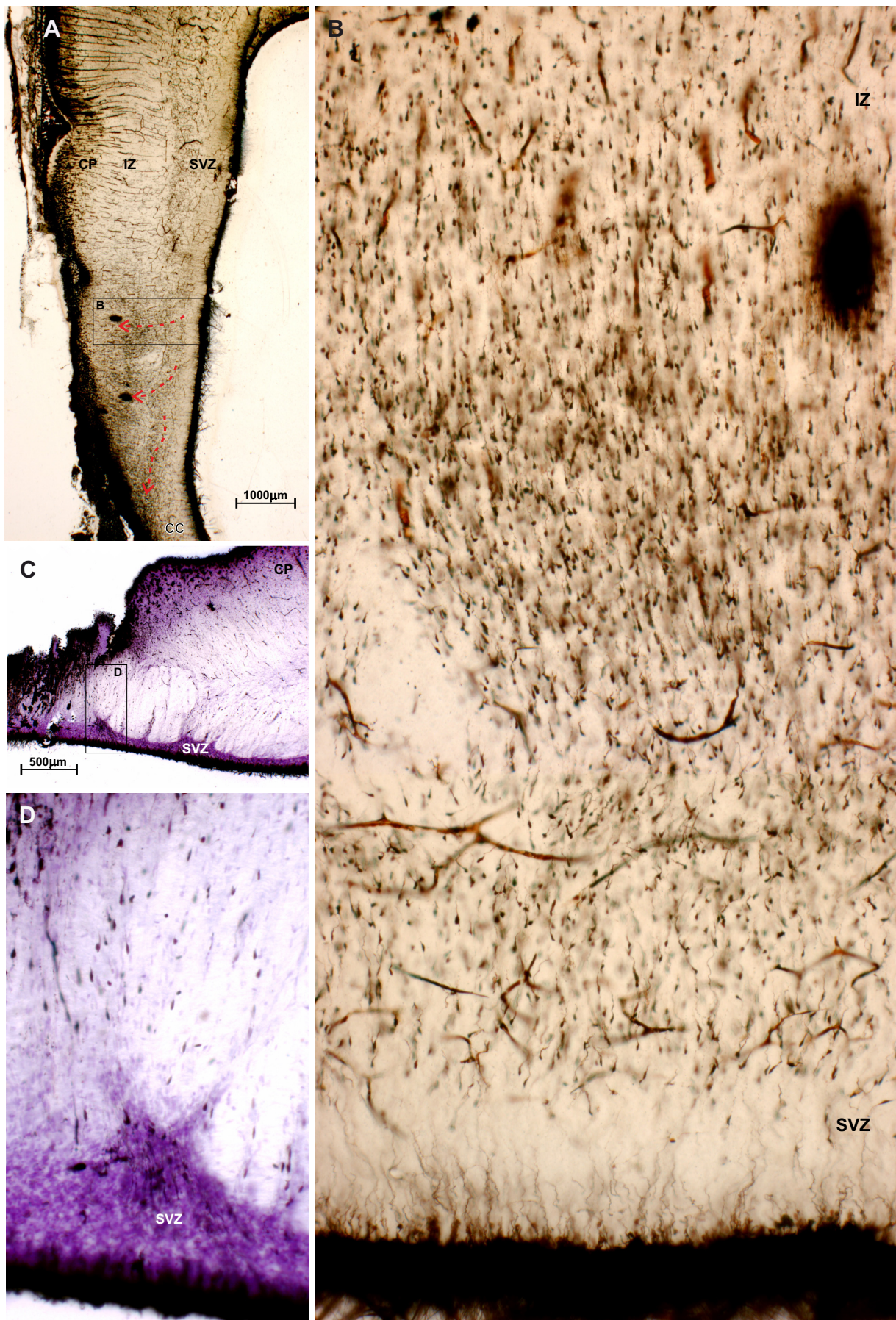
Panel C prikazuje proliferativnu zonu ispod korpus kalozuma u samom rostralnom dijelu iz koje unipolarne stanice radijalno odlaze prema površini i ispunjavaju subkalozalna septa (D).





**Slika 5.112** Fetus čovjeka star 17 tjedana, Golgi impregnirani rezovi. Paneli A-C prikazuju područja označena pravokutnicima na slici 5.111D. Pravokutnik označen na panelu A uvećano je prikazan kao panel D, pravokutnik označen na panelu C uvećano je prikazan kao panel E.





**Slika 5.113** Fetus čovjeka star 17 tjedana, Golgi impregnirani rezovi (A, B) dodatno obojeni Nissl metodom (C, D). Pravokutnik označen na panelu A uvećano je prikazan kao panel B. Pravokutnik označen na panelu C uvećano je prikazan kao panel D.



### 5.3.2 Tangencijalna migracija u majmuna između 75. i 90. embrionalnog dana

U majmuna je analiza u stadiju E75-E90 uključila imunohistokemijski obrađene rezove, ali je na temelju pozadinskog bojenja bilo vidljivo da su morfološka i citoarhitektonska obilježja u ovom stadiju istovjetna obilježjima kod fetusa čovjeka starosti 15-17 tjedana.

Većina stanica vanjske subventrikularne zone reaktivna je na Ki67 što pokazuje da u ovoj zoni dominiraju proliferativne stanice (slika 5.114A), iako je gustoća manja nego u ventrikularnoj zoni i ganglijskom brežuljku. Sporadično su Ki67 pozitivne stanice već u E75 vidljive kroz intermedijalnu zonu, a i Ki67 reaktivnost pokazuje da su u hilusu dentatusa progenitori gusto razmješteni (slika 5.115A). Vidljiva je i migracija progenitora iz ventrikularne zone na spoju hipokampusu i forniksa. U području hipokampusu Mash1 reaktivnost (slika 5.115B) prisutna je u uskoj zoni uz samu ventrikularnu površinu te je također vidljiva zona iz koje se odvajaju Mash1 pozitivne stanice koje putuju prema hilusu. Gustoća Mash1 pozitivnih stanica u hilusu je daleko manja nego Ki67, što je zanimljivo s obzirom da bi progenitori zrnatih stanica dentatusa trebali izražavati Mash1. U dorzalnog telencefalonu gustoća Mash1 stanica uz samu klijetku jednaka je gustoći Ki67 pozitivnih stanica, dok je u subventrikularnoj zoni njihova gustoća daleko manja (slika 5.114B). Distribucija Mash1 stanica ukazuje kako vanjska subventrikularna zona također nastaje od progenitora iz ventrikularne zone, a ne proliferacijom stanica subventrikularne zone.

Intenzivna GAD65 reaktivnost koja je posljedica gusto poredanih stanica vidljiva je u ganglijskom brežuljku, a istovjetan obrazac nastavlja se i kroz ventrikularnu i donji dio subventrikularne zone palijuma (slika 5.116A). U ovim područjima dominiraju okrugle stanice, a dojam je da su sve GAD65 pozitivne. Iz ganglijskog brežuljka izlazi veliki snop gusto poredanih, unipolarnih, migratornih GAD65 reaktivnih stanica koji ulazi u subventrikularnu zonu te je usmjeren u dorzalne i ventralne dijelove palijuma (slika 5.116B). GAD65 pozitivne stanice dorzalnog telencefalona koje imaju okruglu jezgru većinom su Mash1 pozitivne (slika 5.117A i 5.117B) te je jasno kako se radi o progenitorskim stanicama. Mash1 reaktivnost nije prisutna u diferenciranim GAD67 reaktivnim stanicama (slika 5.117C i 5.117D).

Čak i u fetusa majmuna u E109 nemigratorne stanice ventrikularne zone palijuma sintetiziraju GABA-u (slika 5.117E), a može se uočiti izrazito velik broj neradijalno orijentiranih stanica u intermedijalnoj zoni (slika 5.117F), kao i visoka razina Mash1 ekspresije u stanicama ventrikularne zone (slika 5.117G). To jasno ukazuje kako se značajna produkcija GABA-ergičkih neurona nastavlja duboko u drugu polovicu trudnoće.

Kao i kod čovjeka, izrazito je masivna proliferativna zona rostralno od vrha donjeg roga lateralne klijetke (slika 5.118A), koju okružuje snop gusto poredanih migratornih GAD65 stanica (slika 5.118B i 5.119A). U unkusu hipokampusu gomilaju se GAD67 reaktivne stanice, koje se zatim usmjeravaju prema medijalnom dijelu i nastavljaju u marginalnu zonu

(slika 5.119B) što dosta jasno ukazuje da se stanice koje se stvaraju u ovoj proliferativnoj zoni usmjeravaju u marginalnu zonu po kojoj dalje migriraju (slika 5.119C i 5.119D). Gust snop migratornih GAD67 reaktivnih stanica prisutan je u septalnom i bazalnom dijelu telencefalona, oko amigdala i unkusa hipokampi (slika 5.120A-D).

U hipokampalnom području somatostatinski neuroni imaju sličnu distribuciju (slika 5.120E, 5.121A-C) kao i GAD67 pozitivne stanice. U području hipokampusa sličan obrazac distribucije imaju i kalbindin pozitivne stanice (slika 5.121D), no u susjednim mezokortikalnim područjima vide se guste nakupine migratornih stanica koje se nalaze u subventrikularnoj zoni (slika 5.121E i 5.121F) i zatim se usmjeravaju prema kortikalnoj ploči mezokorteksa (slika 5.122B). Velike nakupine gusto zbijenih intenzivno kalbindin reaktivnih stanica prisutne su u subkortikalnim strukturama temporalnog režnja (slika 5.122A). Moguće je da ove stanice potječu iz proliferativnih zona oko vrha temporalnog režnja te se usmjeravaju prema subkortikalnim strukturama i korteksu temporalnog režnja.

Kalbindinske stanice unipolarne morfologije (slika 5.122D) vidljive su i u fornixu gdje se usmjeravaju prema površini, ali je reaktivnost prisutna i u pojedinim dijelovima ventrikularne zone (slika 5.122C). Međutim, u ovom području, a to je rostralni dio korpus kalozuma i forniksa (slika 5.122E), daleko je masivnija kalretininska reaktivnost koja prevladava u proliferativnoj zoni ispod kalozuma i forniksa. Od tuda se snopovi migratornih stanica kroz korpus kalozum (septa) usmjeravaju prema površini i zatim dalje u marginalnu zonu (slika 5.122F i 5.122G). Posebno masivno nakupljanje malih migratornih stanica prisutno je iznad korpus kalozuma u retrosplenijalnom području (slika 5.123), koje se čini glavnim izvorom kalretininskih stanica marginalne zone. Guste nakupine malih kalretininskih stanica su još krajem srednjeg fetalnog razdoblja prisutne i u području diencefalona (slika 5.124A i 5.124C), hipokampusa (slika 5.124B) i subkortikalnih struktura temporalnog režnja (slika 5.124D). To ukazuje da se kalretininske stanice u ovim područjima intenzivno stvaraju i u drugoj polovici trudnoće. U području hipokampusa jasno je vidljivo kako se gusti sloj stanica koji se nalazi na spoju forniksa i hipokampusa nastavlja preko girus dentatusa u marginalnu zonu (slika 5.124E).

U dijelu proliferativne zone koja se nalazi ispod rostralnog dijela korpus kalozuma i forniksa (slika 5.125A) nalaze se nakupine somatostatinskih stanica koje se u tračcima (septa) protežu prema površini (slika 5.125B). Stanice sličnog obrasca bojenja gusto su poredane u gornjoj trećini marginalne zone cingularnog područja (slika 5.125C), dok je dorzalnije u neokortikalnom dijelu marginalne zone (slika 5.125D) ova nakupina nešto tanja. Ovo govori u prilog da stanice koje potječu iz subkalozalnih i subfornikalnih dijelova proliferativne zone migriraju kroz korpus kalozum prema marginalnoj zoni.

Osim migratornih stanica koje izražavaju somatostatin, mogu se vidjeti i brojni dobro diferencirani somatostatinski neuroni koji se u neokortikalnim dijelovima nalaze na granici



marginalne zone i kortikalne ploče (slika 5.125D), na donjoj granici kortikalne ploče (slika 5.125E) i u samom sloju pod pločom (slika 5.125F). Ovo ukazuje kako postoji funkcionalna mreža somatostatinskih neurona u sloju pod pločom i u graničnom području između marginalne zone i kortikalne ploče te koja najvjerojatnije odgovara dijelu diferenciranih neurona koji u ovim područjima u srednjem fetalnom stadiju izražavaju GAD67 (slika 5.126A).

## **Deskriptivna analiza Nissl, Ki67, PCNA, Mash1, GAD65, GAD67, GABA, kalbindinskih i kalretininskih rezova**

**Slika 5.114** Majmun E75, rezovi obrađeni imunohistokemijski na Ki67 (A) i Mash1 (B).

Paneli prikazuju dio dorzalne stijenke telencefalona. Najveća gustoća proliferativnih Ki67 pozitivnih stanica vidljiva je u ventrikularnoj zoni. Iako Ki67 reaktivnost jasno označava vanjsku subventrikularnu zonu i u dijelu subventrikularne zone u koju urastaju vlakna vidljiva je velika gustoća Ki67 stanica. Proliferativne stanice prisutne su samo sporadično u intermedijalnoj zoni. Velika gustoća proliferativnih stanica neposredno uz klijetku nastavlja se kroz medijalni telencefalički zid (A). Uz samu klijetku gustoća Mash1 stanica jednaka je gustoći Ki67 pozitivnih stanica, dok je u subventrikularnoj zoni njihova gustoća manja (B). Kako je gustoća Mash1 pozitivnih stanica u zoni između unutarnje i vanjske subventrikularne zone relativno velika, ovakva distribucija ukazuje na povećanje Mash1 ekspresije u stanicama koje putuju iz ventrikularne u vanjsku subventrikularnu zonu. Ovaj obrazac sličan je stadiju nastanka subventrikularne zone (slika 5.21B) te ukazuje kako i vanjska subventrikularna zona nastaje od progenitora iz ventrikularne zone, a ne od stanica subventrikularne zone.

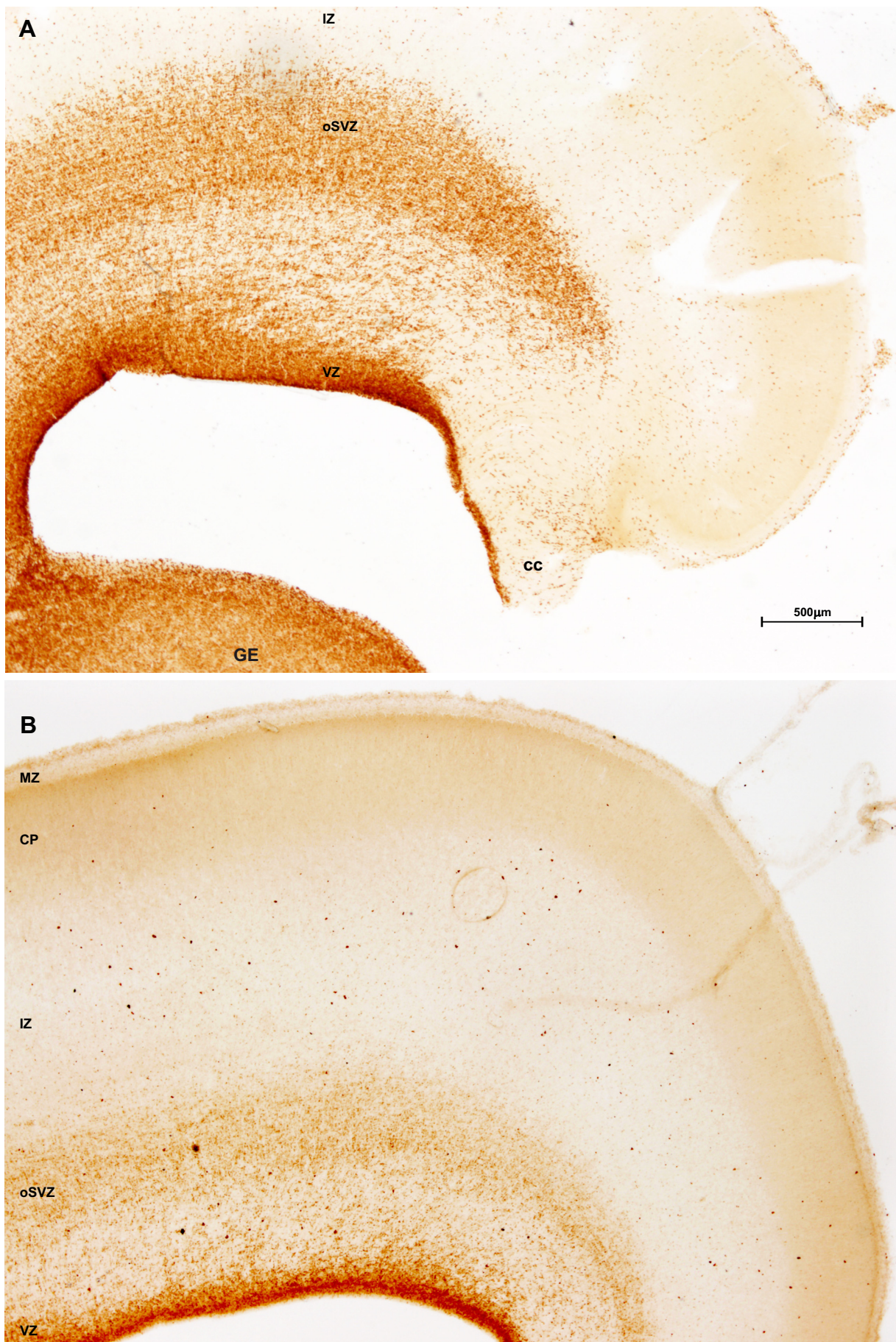
**Slika 5.115** Majmun E75, rezovi obrađeni imunohistokemijski na Ki67 (A) i Mash1 (B).

Paneli prikazuju područje girus dentatusa. U relativno širokoj ventrikularnoj zoni Ki67 reaktivnost ukazuje da sve stanice imaju visoku proliferativnu aktivnost. Iz dijela ventrikularne zone koji je najbliži forniks odvaja se proliferativne stanice koje putuju prema hilusu girus dentatusa (isprekidane strelice, A). Proliferativne stanice vidljive su i u ostalim slojevima (zvjezdica, stratum oriens), izuzev piramidnog (isprekidano područje, A). Mash1 reaktivnost prisutna je u uskoj zoni uz samu ventrikularnu površinu te je također vidljiva zona iz koje se odvajaju Mash1 pozitivne stanice koje putuju prema hilusu (isprekidane strelice, B). Ovakav obrazac Mash1 reaktivnosti nastavlja se i prema forniksu, u kojem se vide brojne slabije reaktivne Mash1 pozitivne stanice (B).

**Slika 5.116** Majmun E75, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD65.

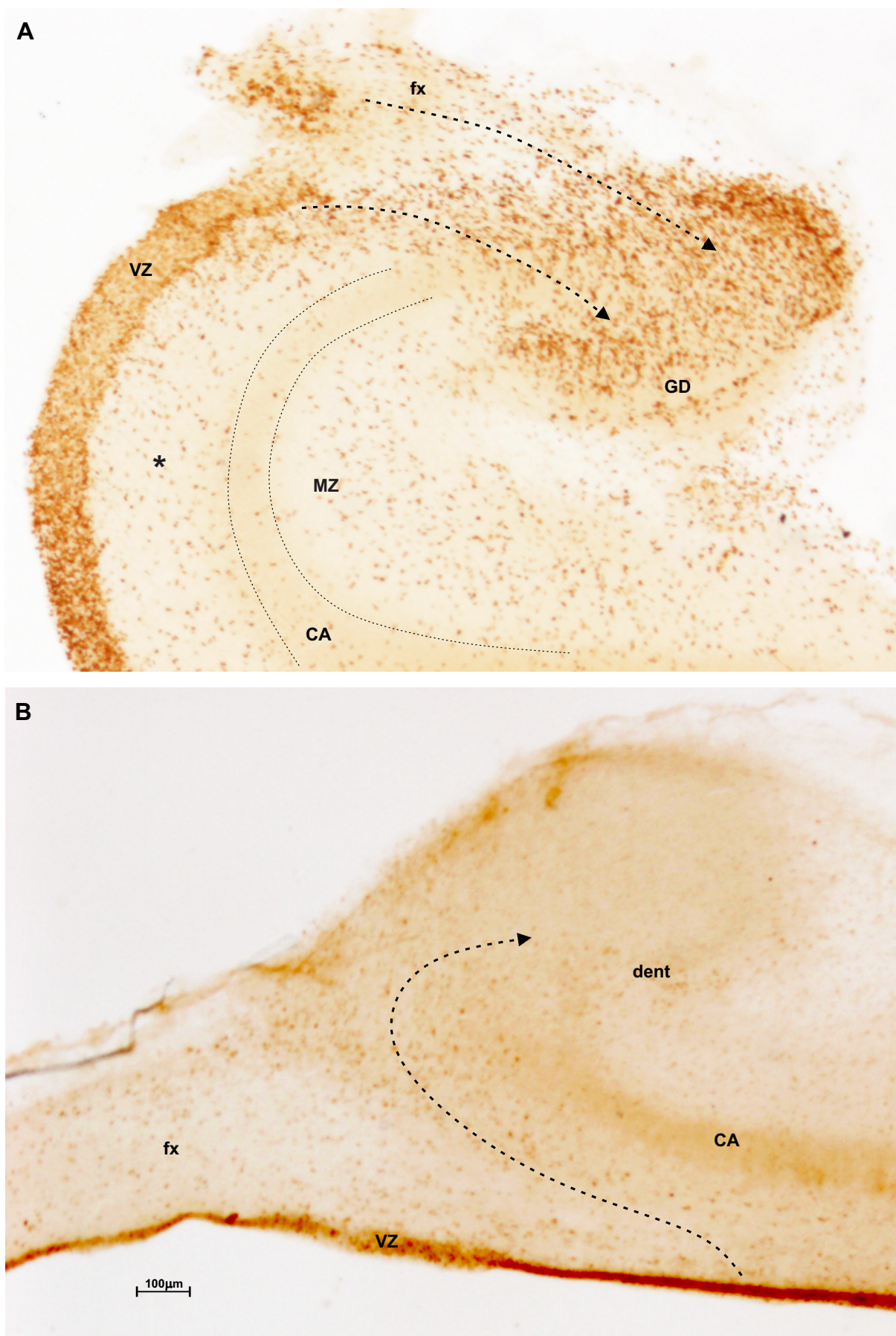
Panel A prikazuje područje dorzalnog dijela telencefaličke stijenke, a panel B dio uz ganglijski brežuljak. GAD65 reaktivne stanice gusto su poredane u ventrikularnoj zoni telencefaličke stijenke, gdje je dojam da su sve stanice GAD65 pozitivne (A). U vanjskoj subventrikularnoj zoni GAD65 reaktivnost visoka je i u manje gusto poredanim migratornim stanicama koje dolaze iz ganglijskog brežuljka (B), ali i u okruglim stanicama sličnim stanicama u ventrikularnoj zoni. Visok stupanj reaktivnosti vidljiv je kroz cjelokupnu marginalnu zonu koja postaje zadebljana u dijelu arhikorteksa (zvjezdica, A). Intenzivna





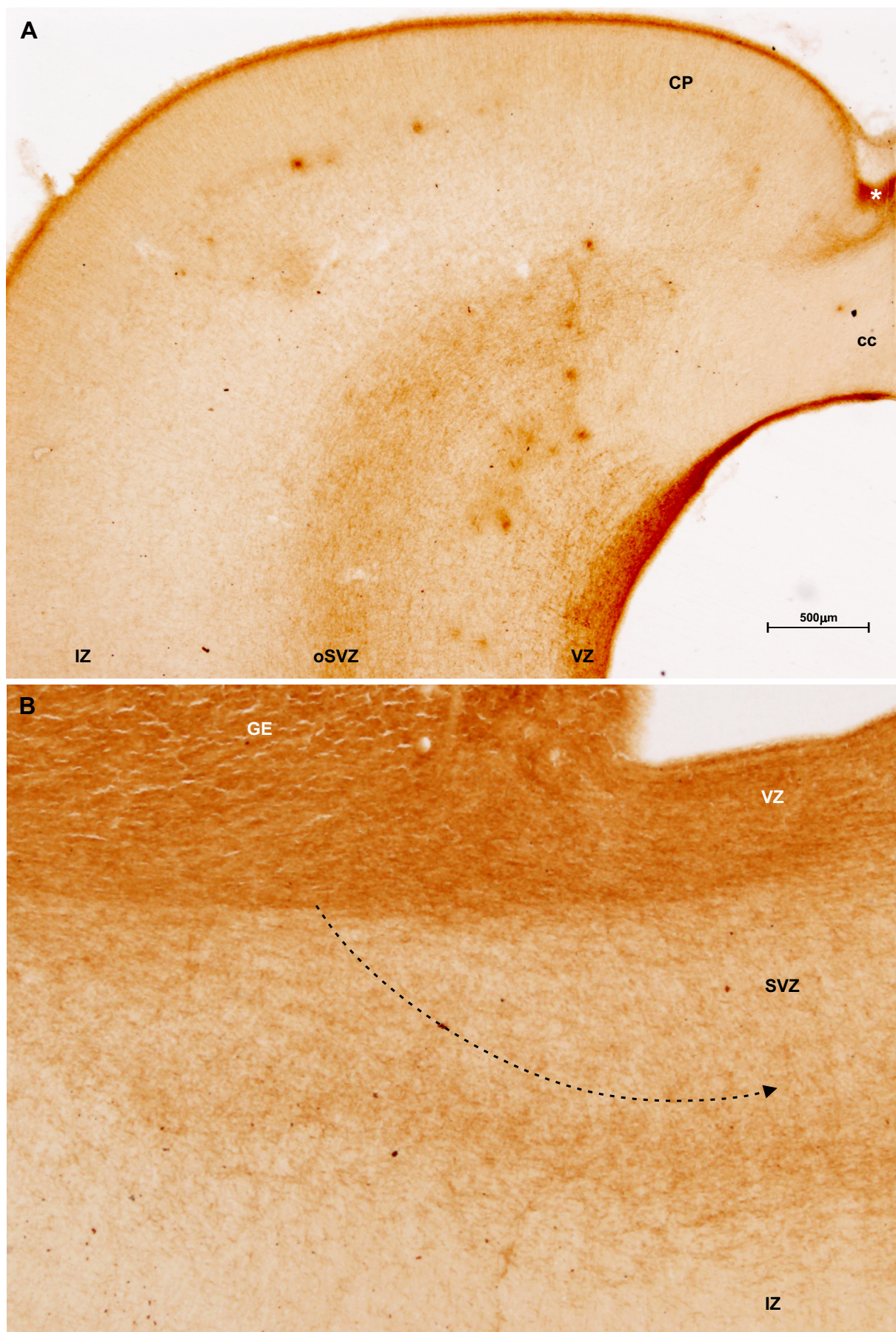
**Slika 5.114** Majmun E75, rezovi obrađeni imunohistokemijski na Ki67 (A) i Mash1 (B).





**Slika 5.115** Majmun E75, rezovi obrađeni imunohistokemijski na Ki67 (A) i Mash1 (B).





**Slika 5.116** Majmun E75, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD65.

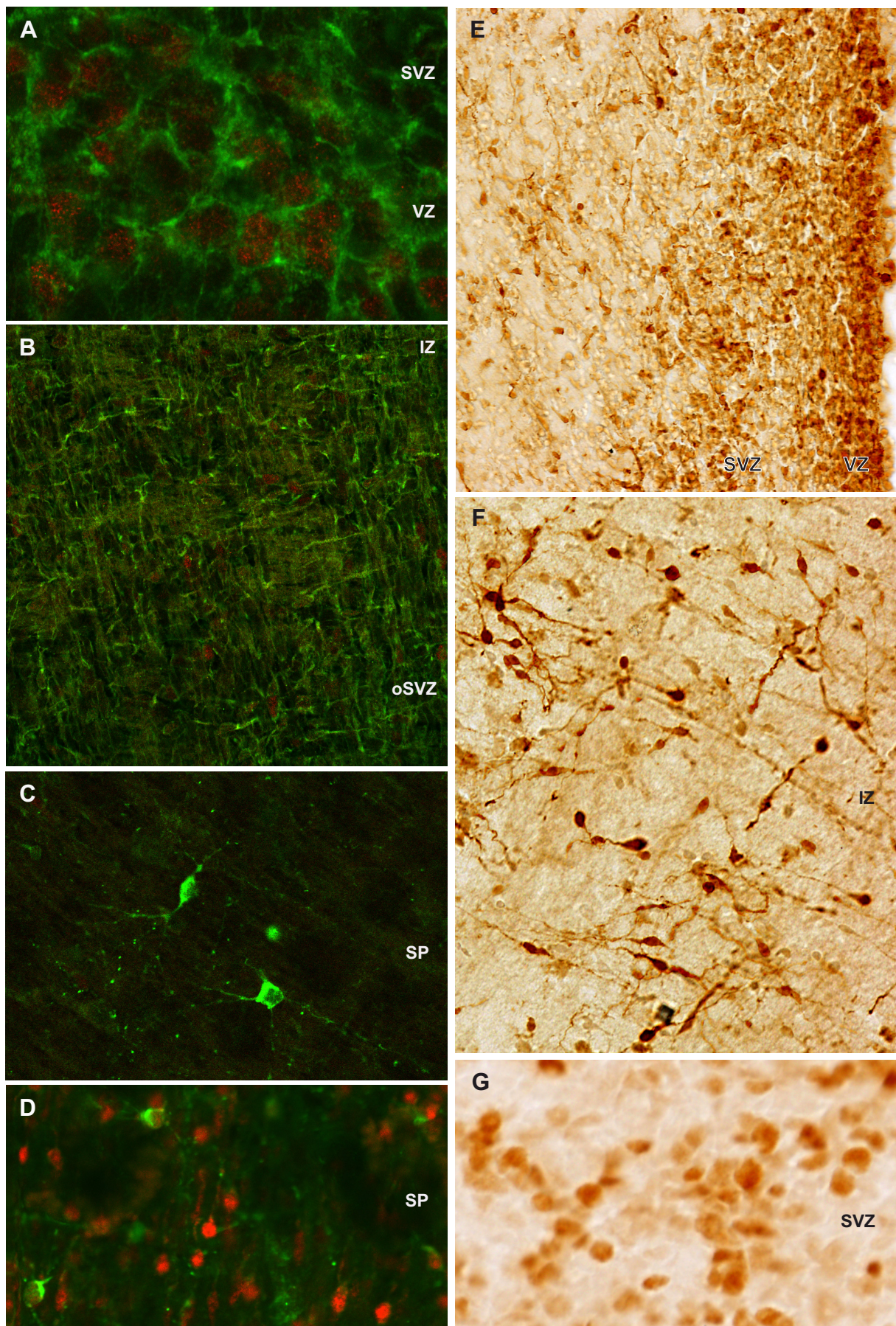
GAD65 reaktivnost koja je posljedica gusto poredanih stanica vidljiva je u ganglijskom brežuljku, a istovjetan obrazac nastavlja se i kroz ventrikularnu i donji dio subventrikularne zone palijuma (B). U ovim područjima dominiraju okrugle stanice, a dojam je da su sve GAD65 pozitivne. Iz ganglijskog brežuljka izlazi veliki snop gusto poredanih, unipolarnih, migratornih GAD65 reaktivnih stanica koji ulazi u subventrikularnu zonu te je usmjeren u dorzalne i ventralne dijelove palijuma (isprekidana strelica).

**Slika 5.117** Majmun E75, rezovi obojeni dvostrukim fluorescentnim bojenjem (zeleno/crveno) na GAD65/Mash1 (A, B), GAD67/Mash1 (C) i GAD67/NeuN (D). Majmun E109, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GABA (E, F) i Mash1 (G).

Stanice ventrikularne zone palijuma (A) pokazuju jaku citoplazmatsku GAD65 aktivnost (zeleno) i nemaju migratornu, već ovalno multipolarnu morfologiju. Većina ovih stanica pokazuje jaku nuklearnu Mash1 aktivnost (crveno), što ukazuje kako se radi o progenitorima GABA-ergičkih neurona. U vanjskom dijelu subventrikularne zone palijuma (B) dominiraju tangencijalno orijentirane stanice unipolarne migratorne morfologije koje nisu reaktivne ili imaju nizak stupanj Mash1 reaktivnosti. Manji broj ne-tangencijalno orijentiranih stanica multipolarne morfologije pokazuje visok stupanj Mash1 reaktivnosti, slično kao i u ventrikularnoj zoni. Ovo ukazuje kako se GABA-ergički progenitori nalaze i u vanjskom dijelu subventrikularne zone palijuma. Dobro diferencirani, multipolarni GAD67 reaktivni neuroni ispod kortikalne ploče ne pokazuju Mash1 reaktivnost (C), ali su NeuN reaktivni (D). Ovi podaci ukazuju kako ekspresija Mash1 opada u postmitotičkim neuronima te kako diferencirani GABA-ergički neuroni nemaju prepoznatljivu razinu Mash1 ekspresije. Također, većina progenitora GABA-ergičkih neurona u ganglijskom brežuljku i kortikalnim proliferativnim zonama prvo izražava GAD65 koji je, kao i u migratornim neuronima, vidljiv u tijelu i nastavcima. Kod diferenciranih neurona GAD65 se redistribuira u aksone, a u tijelu i dendritima počinje dominirati ekspresija GAD67.

U nemigratornim stanicama ventrikularne zone palijuma (E) može se zapaziti i GABA reaktivnost, koja se pojačava u migratornim stanicama. To ukazuje kako izražavanje GAD65 u progenitorima omogućava sintezu GABA-e. Jasno prepoznavanje progenitora u majmuna starosti E109 (E), izrazito velik broj neradijalno orijentiranih stanica u intermedijalnoj zoni (F), kao i visoka razina Mash1 ekspresije u stanicama ventrikularne zone u stadiju E109 (G), ukazuje kako se značajna produkcija GABA-ergičkih neurona nastavlja i u kasno fetalno razdoblje.





**Slika 5.117** Majmun E75, rezovi obojeni dvostrukim fluorescentnim bojenjem (zeleno/crveno) na GAD65/Mash1 (A, B), GAD67/Mash1 (C) i GAD67/NeuN (D) i E109, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GABA (E, F) i Mash1 (G).

**Slika 5.118** Majmun E75, rez obrađen imunohistokemijski na PCNA (A) i GAD65 (B). Pravokutnik označen na panelu B uvećano je prikazan kao slika 5.119A.

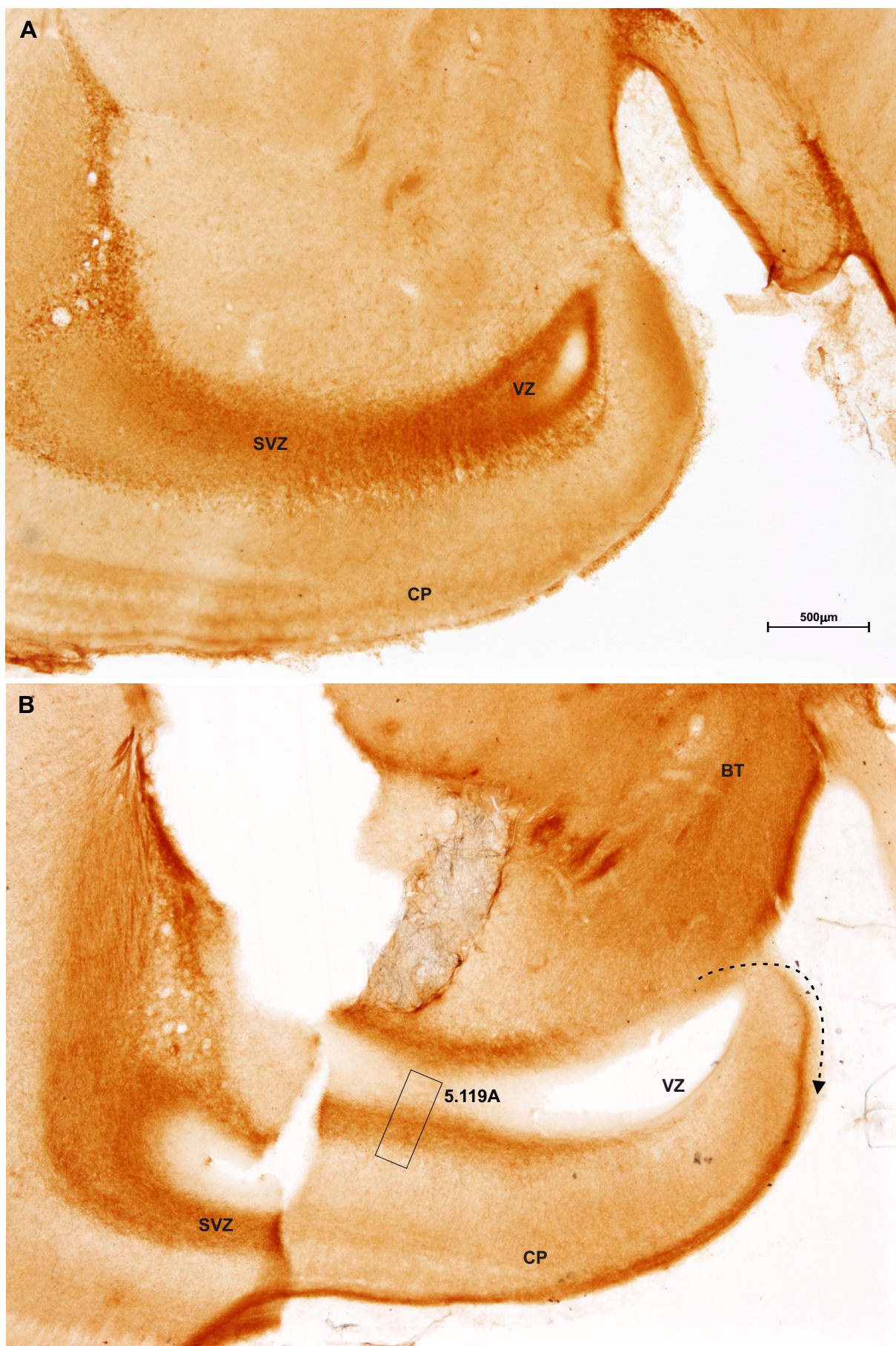
Paneli prikazuju područje oko rostralnog dijela proliferativne zone temporalnog režnja oko vrha donjeg roga lateralne klijetke. PCNA bojenje jasno pokazuje gusto zbijene, proliferativne stanice oko vrha temporalnog roga lateralne moždane klijetke (A), koje okružuje snop gusto poredanih migratornih GAD65 stanica (B). Sličan obrazac GAD65 reaktivnosti prisutan je i u marginalnoj zoni, što ukazuje na mogući put migracije GABA-ergičkih neurona od proliferativne zone temporalnog režnja u marginalnu zonu.

**Slika 5.119** Majmun E75, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD65 (A), GAD67 (B), Mash1 (C) i E90, rez obojen Nissl metodom (D). Panel A prikazuje područje označeno pravokutnikom na slici 5.118B. Pravokutnici označeni na panelu B uvećano su prikazani kao slika 5.120C i D.

U ventrikularnoj zoni nema GAD65 pozitivnih stanica, ali se njihov broj povećava kroz subventrikularnu zonu iznad koje tvore gusto zbijen snop (A). U unkusu hipokampusu gomilaju se GAD67 reaktivne stanice, koje se zatim usmjeravaju prema medijalnom dijelu i nastavljaju u marginalnu zonu (B).

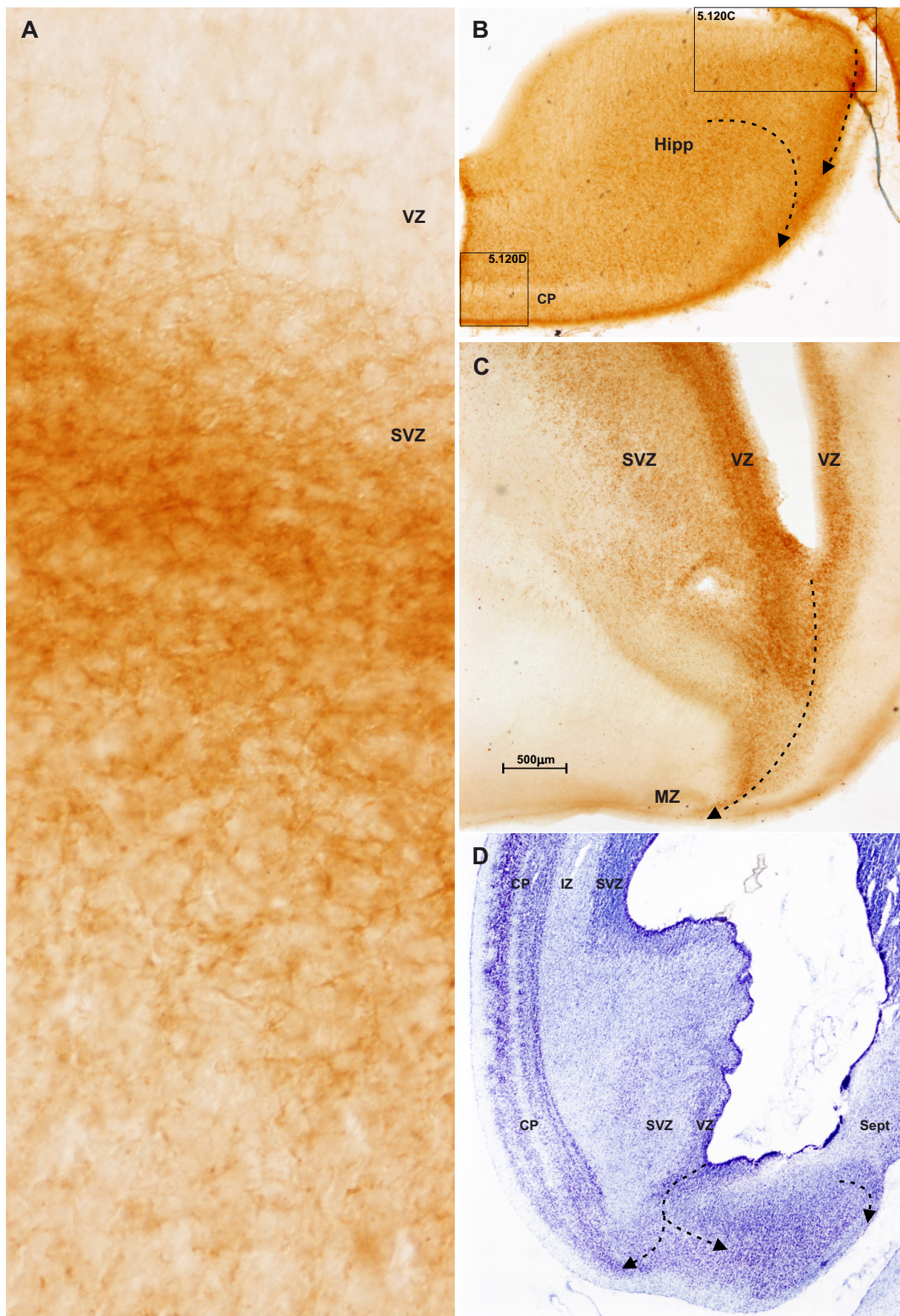
Većina stanica proliferativne zone u temporalnom režnju (C) pokazuje intenzivnu Mash1 reaktivnost, koja se polako smanjuje kako se stanice odmiču, a snop Mash1 reaktivnih stanica usmjeren je prema marginalnoj zoni (C). Nissl bojenje u kasnijem stadiju (E90) ukazuje da se i tada još uvijek u ovom području stvaraju neuroni te usmjeravaju prema marginalnoj zoni (D).





**Slika 5.118** Majmun E75, rez obrađen imunohistokemijski na PCNA (A) i GAD65 (B). Pravokutnik označen na panelu B uvećano je prikazan kao slika 5.119A.





**Slika 5.119** Majmun E75, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD65 (A), GAD67 (B), Mash1 (C) i E90, rez obojen Nissl metodom (D). Panel A prikazuje područje označeno pravokutnikom na slici 5.118B.



**Slika 5.120** Majmun E75, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD67 (A-D) i somatostatin (E). Paneli C i D prikazuju područja označena pravokutnicima na slici 5.119B. Panel E je susjedan rez koji odgovara području na panelu D.

Cjelokupna površina dorzalnog dijela septalnog područja prožeta je gusto zbijenim GAD67 pozitivnim stanicama (A). Visoka gustoća prisutna je i ventralno sve do prednje komisure te je vidljiv kontinuitet ovih stanica prema strijatumu. U septalnom dijelu intenzivno su reaktivne i stanice ventrikularne zone, dok u ganglijskom brežuljku nema GAD67 reaktivnosti. Na kaudalnijem presjeku koji prolazi kroz vrh temporalnog režnja (B) i predstavlja ekstenziju prema septalnom području, medijalno je vidljiva veća gustoća GAD67 stanica koje ulaze u marginalnu zonu.

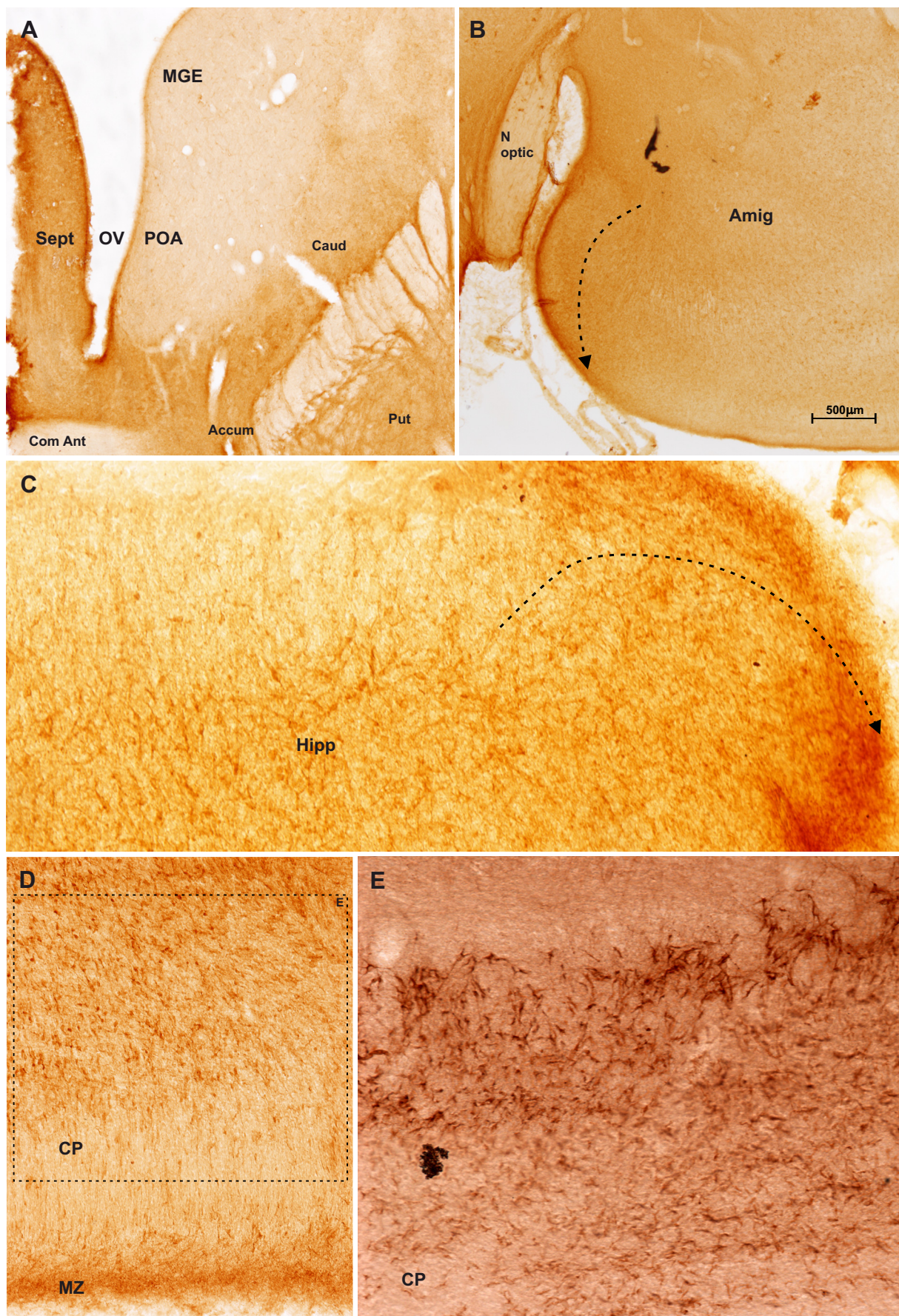
U području vrha unkusa hipokampusa migratorne GAD67 pozitivne stanice gomilaju se od središnjeg dijela do marginalne zone (C). U području mezokorteksa (D) migratorne stanice gomilaju se ispod kortikalne ploče, kao i u gornjoj trećini marginalne zone. U preostalom dijelu marginalne zone migratorne stanice su raspršene. Brojne stanice radijalno prolaze kroz kortikalnu ploču.

Na susjednom rezu u području mezokorteksa migratorne somatostatinske stanice (E) nalaze se u donjem dijelu kortikalne ploče, a intenzivnije reaktivne stanice u području ispod kortikalne ploče. Obrazac bojenja i morfologije istovjetan je kao na GAD67 obrađenim rezovima (panel D).

**Slika 5.121** Majmun E75, rezovi obrađeni imunohistokemijski na somatostatin (A, B) i E83, rez obojen dvostrukim bojenjem (smeđe/crveno) na somatostatin/NeuN (C), rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalbindin (D-F). Pravokutnik označen na panelu A uvećano je prikazan kao panel B. Pravokutnici označeni na panelu D uvećano su prikazani kao paneli E i slika 5.122B. Pravokutnik označen na panelu E uvećano je prikazan kao panel F.

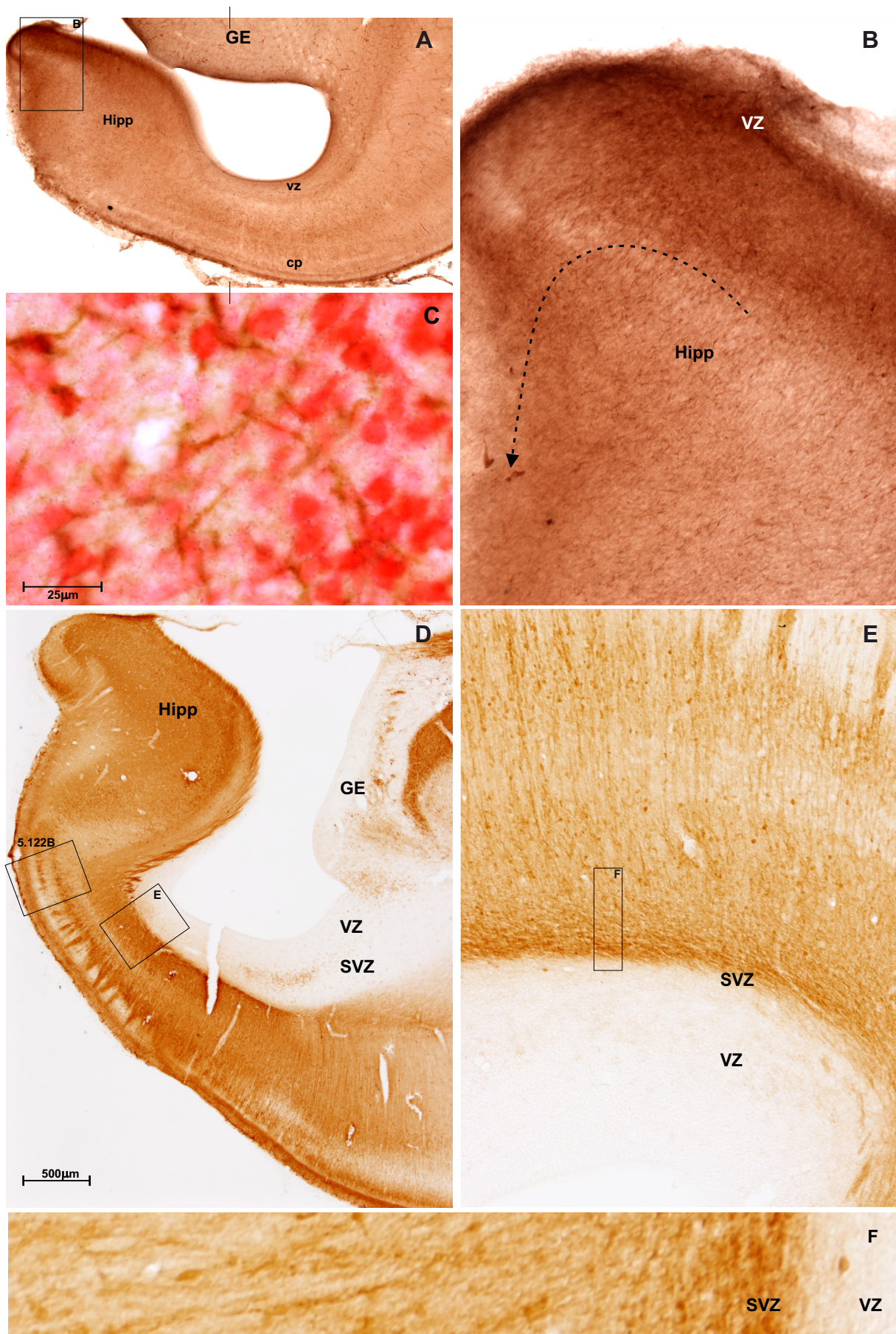
Iznad somatostatinske reaktivnosti u ventrikularnoj zoni hipokampusa vide se guste nakupine somatostatin reaktivnih nastavaka koji se dalje šire prema marginalnoj zoni (A, B). Dvostruko bojenje s neuralnim biljegom (NeuN) pokazuje da se radi o nastavcima neurona (C).

Područje hipokampusa i pridruženo entorinalno područje (D) ispunjeni su intenzivno reaktivnim kalbindinskim stanicama. Na velikom povećanju (F) vidljivo je kako kalbindinske reaktivnosti nema u mezokortikalnoj proliferativnoj zoni, ali da se neposredno iznad nje, u subventrikularnoj zoni, nalazi snop gusto poredanih tangencijalno orijentiranih stanica od kojih se odvajaju stanice koje se usmjeravaju prema piji (E).



**Slika 5.120** Majmun E75, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD67 (A-D) i somatostatin (E). Paneli C i D prikazuju područja označena pravokutnicima na slici 5.119B. Panel E je susjedan rez koji odgovara području na panelu D.





**Slika 5.121** Majmun E75, rezovi obrađeni imunohistokemijski na somatostatin (A, B) i E83, rez obojen dvostrukim bojenjem (smeđe/crveno) na somatostatin/NeuN (C), rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalbindin (D-F). Pravokutnik označen na panelu A uvećano je prikazan kao panel B. Pravokutnici označeni na panelu D uvećano su prikazani kao paneli E i slika 5.122B. Pravokutnik označen na panelu E uvećano je prikazan kao panel F.

**Slika 5.122** Majmun E83, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalbindin (A-D) i kalretinin (E-G). Panel B prikazuje područje označeno pravokutnikom na slici 5.121D. Pravokutnik označen na panelu C uvećano je prikazan kao panel D. Pravokutnici označeni na panelu E uvećano su prikazani kao paneli F i G.

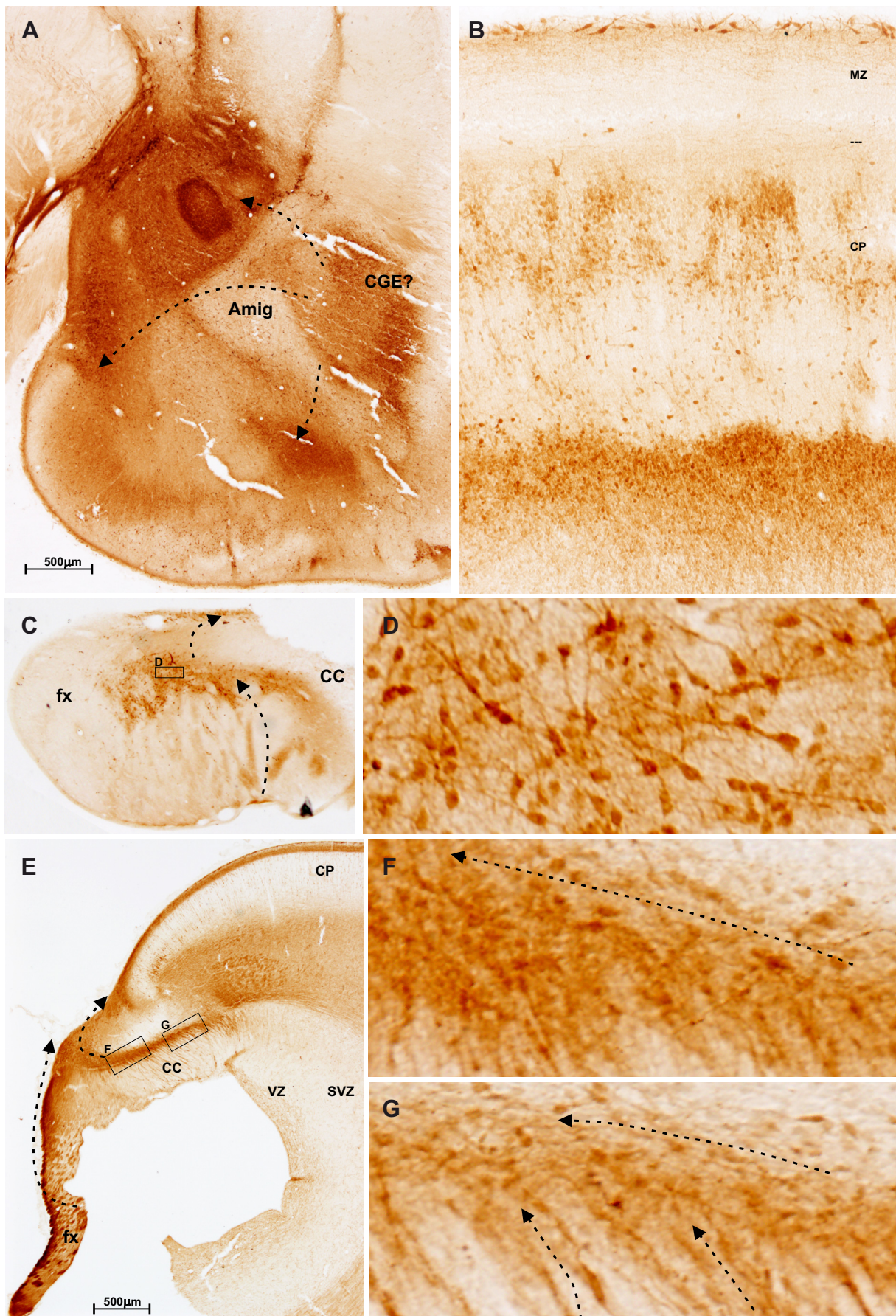
Na susjednom rostralnijem rezu koji prolazi kroz područje amigdala također su vidljive velike nakupine intenzivno reaktivnih kalbindinskih stanica unutra i oko amigdala (A). Moguće je da ove stanice potječu iz proliferativnih zona oko vrha temporalnog režnja te se usmjeravaju prema subkortikalnim strukturama i korteksu temporalnog režnja. U području subikuluma (B, uvećan prikaz s prethodne slike) vidljive su masivne nakupine kalbindin pozitivnih stanica ispod kortikalne ploče koje najvjerojatnije odgovaraju migratornim stanicama. Iznad korpus kalozuma i forniksa vidljive su nakupine kalbindin pozitivnih stanica jasne unipolarne migratorne morfologije (D).

U rostralnom dijelu korpus kalozuma i forniksa (E), vidljiva je kalretininska reaktivnost u proliferativnoj zoni ispod kalozuma i forniksa te snopovi stanica koji vertikalno kroz korpus kalozum (septa) dolaze u područje iznad korpus kalozuma i cingularnog korteksa. Na većem povećanju (F, G) vidljivo je kako se radi o gusto zbijenim stanicama migratorne morfologije.

**Slika 5.123** Majmun E90, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalretinin. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli B i C.

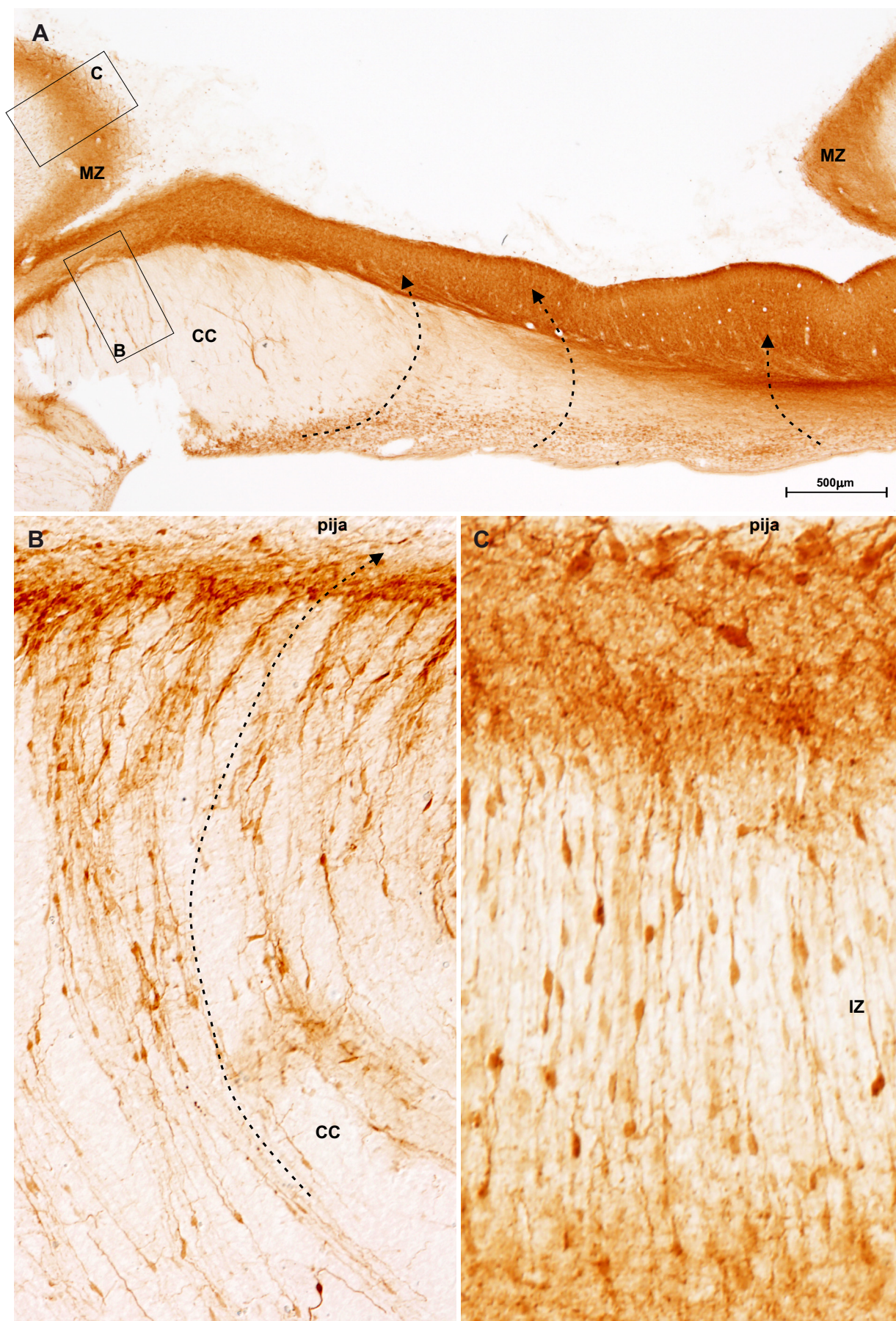
Panel A prikazuje područje splenijuma korpus kalozuma. Vidljivo je masivno nakupljanje gusto poredanih kalretininskih stanica na površini korpus kalozuma u kaudalnom dijelu iznad splenijuma. Stanice prolaze kroz korpus kalozum, od ventrikularno prema pijalno, u vertikalno orijentiranim nakupinama (septa, B). U kaudalnijem dijelu, neposredno iza korpus kalozuma, kalretininske stanice migriraju kroz kortikalnu ploču prema marginalnoj zoni (C).





**Slika 5.122** Majmun E83, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalbindin (A-D) i kalretinin (E-G). Panel B prikazuje područje označeno pravokutnikom na slici 5.121D. Pravokutnik označen na panelu C uvećano je prikazan kao panel D. Pravokutnici označeni na panelu E uvećano su prikazani kao paneli F i G.





**Slika 5.123** Majmun E90, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalretinin. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli B i C.



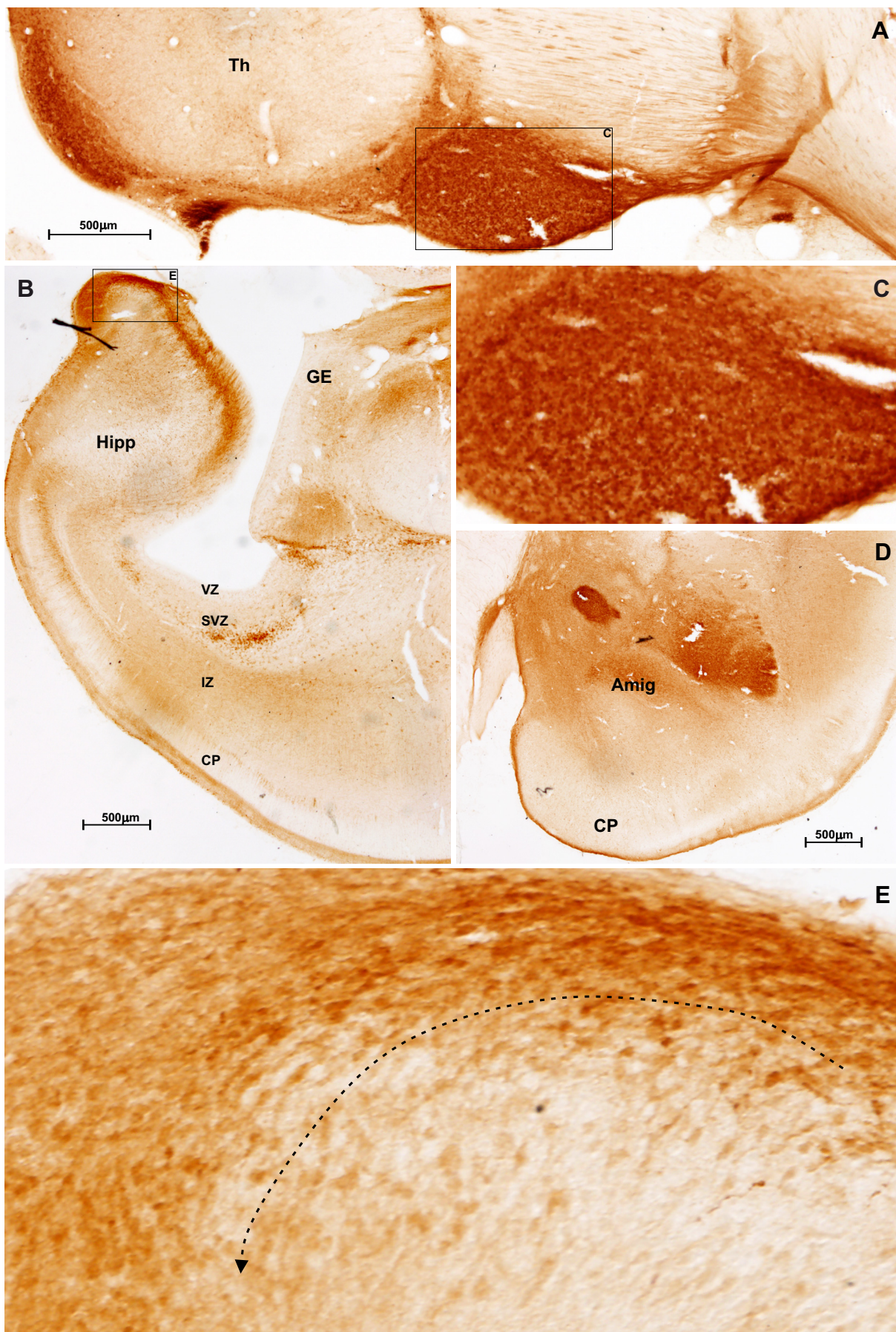
**Slika 5.124** Majmun E90, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalretinin. Pravokutnici označeni na panelu A i B uvećano su prikazani kao paneli C i E.

Panel A pokazuje masivne nakupine kalretininskih stanica na bazi i ventromedijalnom dijelu diencefalona. Vidljivo je kako se radi o gusto zbijenim, visoko reaktivnim stanicama (C), a ovakve nakupine vidljive su i u centro-medijalnom i lateranom dijelu amigdala i periamigdaloidnom području (D). U području unkusa hipokampusa (B), iznad ventrikularne zone vidljive su nakupine kalretininskih stanica koje se protežu od proliferativne zone temporalnog roga klijetke prema vrhu hipokampusa gdje ulaze u marginalnu zonu (E), a dijelom se nakupljaju u sredini ukusa.

**Slika 5.125** Majmun E75, rezovi obrađeni imunohistokemijski na somatostatin. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli B i C.

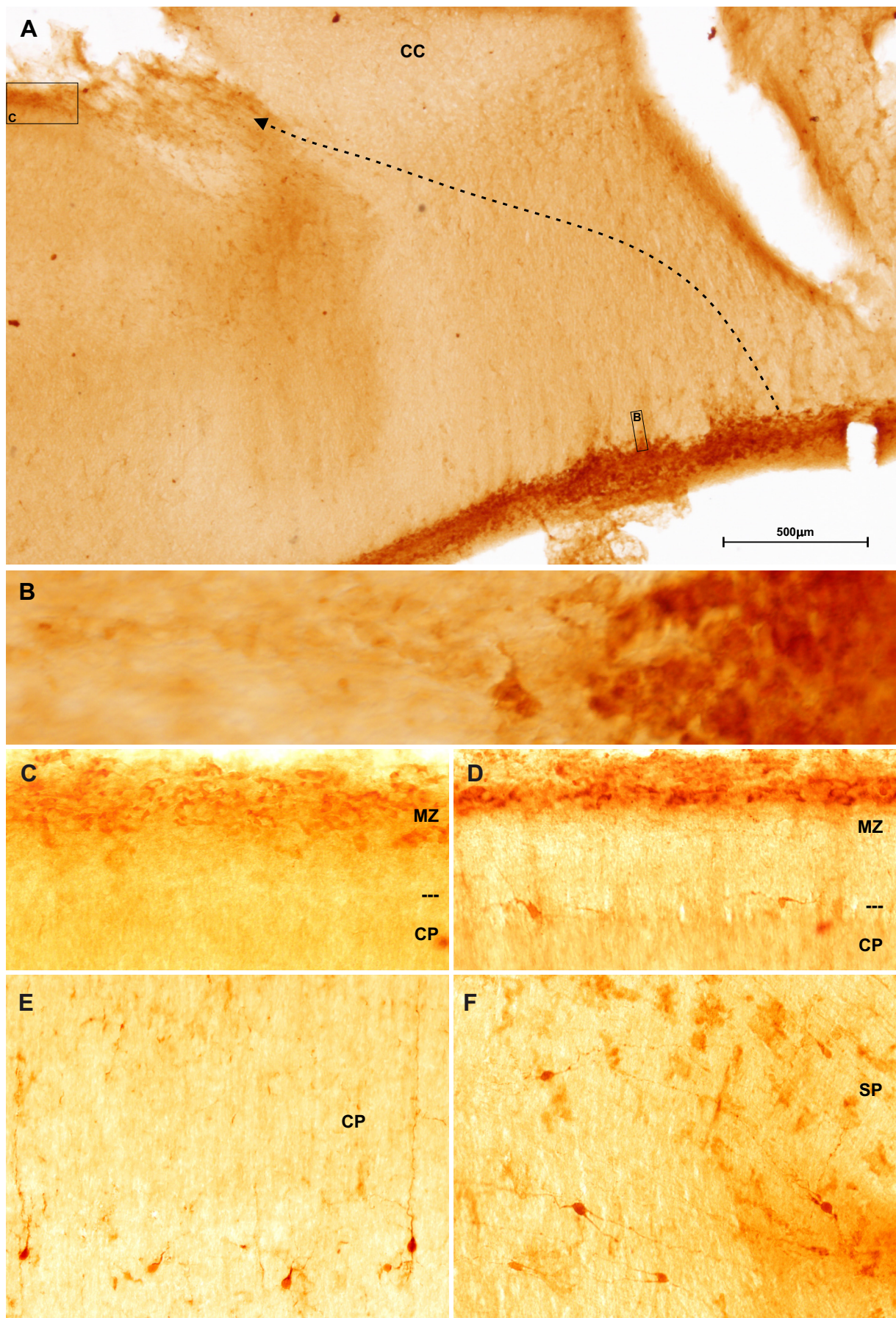
Paneli prikazuju područje rostralnog dijela korpus kalozuma (A-C) i pridruženog dorzalnog dijela telencefalona (D-F). U dijelu proliferativne zone koja se nalazi ispod rostralnog dijela korpus kalozuma i forniksa (A) nalaze se nakupine somatostatinskih stanica koje se u tračcima (septa) protežu prema površini (B, panel zaokrenut za 90° u smjeru suprotnom od kazaljke na satu). Stanice sličnog obrasca bojenja gusto su poredane u gornjoj trećini marginalne zone cingularnog područja (C), dok je u dorzalnije u neokortikalnom dijelu marginalne zone (D) ova nakupina nešto tanja. Ovo govori u prilog da stanice koje potječu iz subkalozalnih i subfornikalnih dijelova proliferativne zone migriraju kroz korpus kalozum prema marginalnoj zoni.

U neokortikalnim dijelovima (D) na granici marginalne zone i kortikalne ploče vidljivi su dobro diferencirani somatostatinski neuroni, kruškolikog i multipolarnog oblika sa dendritima koji se granaju u marginalnoj zoni. Na donjoj granici kortikalne ploče (E) vidljivi su dobro diferencirani somatostatinski neuroni ovalnog oblika s dominantnim dendritom koji se proteže u kortikalnu ploču. U samom sloju pod pločom (F) nalaze se brojni diferencirani neuroni s dugačkim denritima. Ovo ukazuje kako postoji funkcionalna mreža somatostatinskih neurona u sloju pod pločom i u graničnom području između marginalne zone i kortikalne ploče.



**Slika 5.124** Majmun E90, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalretinin. Pravokutnici označeni na panelu A i B uvećano su prikazani kao paneli C i E.





**Slika 5.125** Majmun E75, rezovi obrađeni imunohistokemijski na somatostatin. Pravokutnici označeni na panelu A uvećano su prikazani kao paneli B i C.

### 5.3.3 Marginalna zona kao put tangencijalne migracije

Podaci prikazani u ovom radu pokazuju kako je marginalna zona u majmuna i čovjeka važan put migracije stanica stvorenih u medijalnom telencefaličkom zidu, kao i u drugim dijelovima proliferativnih zona bazalnog telencefalona, uključujući proliferativne zone oko vrha temporalnog roga lateralnih komora. U majmuna u stadiju E75 nalazimo najveću gustoću stanica unutar marginalne zone (slika 5.125C, 5.125D, 5.126 i 5.127). Kada se uzme u obzir povećanje širine zone u odnosu na prethodne stadije, kao i povećanje površine korteksa, jasno je da tijekom srednjeg fetalnog razdoblja marginalna zona predstavlja, uz migratorni snop u subventrikularnoj zoni, najvažniji put tangencijalne migracije.

Marginalna zona na GAD67 preparatima pokazuje tri podsloja reaktivnosti (slika 5.126B), dva deblja koja zajedno zauzimaju približno polovicu površine marginalne zone, jedan smješten subpijalno i drugi oko sredine marginalne zone te jedan tanji na granici marginalne zone i kortikalne ploče. Svi podslojevi ispunjeni su gusto poredanim ovalnim stanicama. Na GAD65 preparatima (slika 5.126C) reaktivnost je vidljiva samo u gornjoj četvrtini marginalne zone te odgovara subpijalnom podsloju na GAD67 preparatima. Ovakva distribucija GAD reaktivnosti ukazuje na dva puta migracije GABA-ergičkih neurona kroz marginalnu zonu. Različitost u stupnju izražavanja GAD65 u migratornim putevima ukazuje na različito mjesto porijekla ovih tangencijalno migrirajućih stanica. Na AChE preparatima je vidljivo kako u marginalnoj zoni brojnošću prevladavaju male stanice koje uglavnom odgovaraju migratornim stanicama (slika 5.126D i 5.126E). U subpijalnom dijelu gdje su gusto poredane i male stanice nalaze se i velike, intenzivno reaktivne, većinom tangencijalno orijentirane Cajal-Retziusove stanice, koje osim AChE izražavaju i kalbindin i kalretinin (slika 5.127). U dubokoj trećini marginalne zone nalazi se relativno širok i vlaknima gusto isprepleten sloj kalbindin i kalretinin reaktivnih vlakana, ali se čini kako se unutar tog sloja nalaze i brojne male kalretinin pozitivne stanice.

U stadiju E83 se kod majmuna marginalna zona može podijeliti na sljedeće podslojeve (slika 5.127): 1. subpijalni sloj s gusto poredanim zrnatim stanicama i velikim Cajal-Retziusovim stanicama (stratum subpiale granulare et magnocelulare); 2. proziran sloj s rjeđe distribuiranim malim zrnatim stanicama (stratum hypocelulare lucidum superficiale); 3. debeli sloj gusto poredanih zrnatih stanica u središnjem dijelu marginalne zone (stratum granulare); 4. proziran dio marginalne zone koji sadrži gusto poredane horizontalno postavljene aksone s malo stanica (stratum hypocelulare fibrilare ); 5. jedan sloj zrnatih, piriformnih stanica koje su grupirane u otočiće (stratum granulare profundus); 6. tanak proziran sloj u kojem se vide pojedinačne stanice koje se odvajaju od kortikalne ploče (stratum lucidum profundus).



Ovako složenu strukturu i istovjetnu laminarnu organizaciju marginalna zona ima i kod čovjeka sredinom trudnoće (slika 5.128A). Do početka srednjeg fetalnog razdoblja stanice u marginalnoj zoni su rijetke, gotovo isključivo smještene subpikalno (slika 5.128B-D), a tek se u 15. tjednu stanice češće počinju zapažati kroz cjelokupan sloj (slika 5.128E), da bi u 17. tjednu bilo vidljivo i stvaranje drugog debljeg podsloja u sredini same zone (slika 5.128F). Treba uočiti da se debljina marginalne zone između 17. i 20. tjedna udvostručuje, a i gustoća stanica se poveća nekoliko puta. Uz veliko povećanje površine korteksa, može se pretpostaviti da se broj migratornih stanica u marginalnoj zoni tijekom ovog razdoblja poveća najmanje 10 puta, što ukazuje da je sredinom trudnoće marginalna zona jedan od glavnih migratornih puteva. Moguće je da ona predstavlja put migracije kalretininskih neurona (slika 5.129A) od kojih je većina smještena u slojevima I-III i koji su posebno brojni u majmuna i čovjeka.

Međutim, u marginalnoj zoni se već sredinom trudnoće mogu uočiti i NeuN pozitivne stanice, kao i sinaptički elementi koji govore da se u marginalnoj zoni nalaze i diferencirane stanice koje uspostavljaju funkcionalnu neuralnu mrežu (slika 5.129 i 5.130) te da ona nije samo migratorni odjeljak.

## Deskriptivna analiza rezova marginalne zone tijekom fetalnog razdoblja

**Slika 5.126** Majmun E75, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD67 (A, B) i GAD65 (C) i E83 rezovi obrađeni imunohistokemijski na AChE (D, E). Pravokutnik označen na panelu D uvećano je prikazan kao panel E.

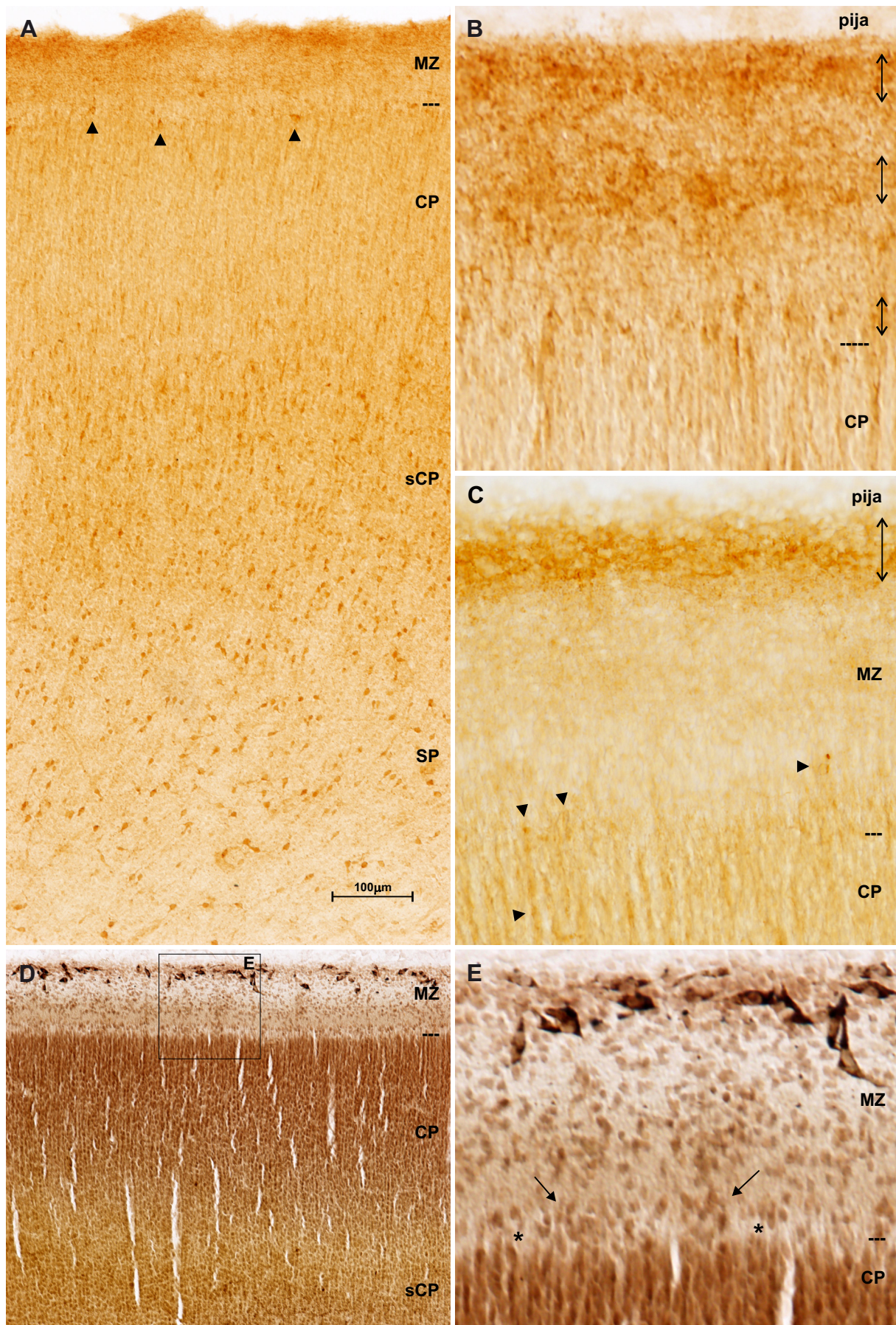
Panel A pokazuje presjek kroz gornji dio telencefaličkog zida u području neokorteksa. Intenzivno reaktivne GAD67 pozitivne stanice koje nemaju migratornu morfologiju gusto su poredane kroz sloj pod pločom i donju polovicu kortikalne ploče. Donji, razrijeđeni dio kortikalne ploče s visokom gustoćom diferenciranih reaktivnih GAD67 neurona najvjerojatnije predstavlja dio kortikalne ploče koja će se transformirati u dio sloja pod pločom. Laminacija kortikalne ploče na površini, kondenzirani dio s gusto poredanim stanicama i dublji u kojem su stanice rjeđe poredane, vidljiva je na AChE obrađenim rezovima (D). Najbolje diferencirani GAD67 reaktivni neuroni smješteni su u sloju pod pločom i graničnom području između marginalne zone i kortikalne ploče (vrh strelice, A). Ovi potonji imaju morfologiju istovjetnu somatostatinskim neuronima. GAD67 reaktivni neuroni sve su više diferencirani od sredine kortikalne ploče i kroz sloj pod pločom prema intermedijalnoj zoni.

Marginalna zona na GAD67 preparatima pokazuje tri podsloja reaktivnosti (B), dva deblja koja zajedno zauzimaju približno polovicu površine marginalne zone, jedan smješten subpijalno i drugi oko sredine marginalne zone te jedan tanji na granici marginalne zone i kortikalne ploče. Tanji sloj ispunjen je diskontinuiranim redom stanica piramidnog ili ovalnog oblika koje su valovito distribuirane pa su neke jasno odvojene od kortikalne ploče, a druge se nalaze u samom vrhu. Druga dva podsloja ispunjena su gusto poredanim ovalnim stanicama.

Na GAD65 preparatima (C) reaktivnost je vidljiva samo u gornjoj četvrtini marginalne zone te odgovara subpijalnom podsloju na GAD67 preparatima. Dok u srednjem dijelu marginalne zone nema brojnih reaktivnih stanica, na granici marginalne zone i kortikalne ploče vidljive su GAD65 reaktivne stanice (vrh strelice, C). Ovakva distribucija GAD reaktivnosti ukazuje na dva puta migracije GABA-ergičkih neurona kroz marginalnu zonu. Različitost u stupnju izražavanja GAD65 u migratornim putevima ukazuje na različito mjesto porijekla ovih tangencijalno migrirajućih stanica.

AChE reaktivnost (D, E) pokazuje kako površnja polovica marginalne zone ima svjetlije pozadinsko bojenje od dublje polovice. Na granici prema kortikalnoj ploči nalazi se tanki svijetli sloj (zvjezdica, E) iznad kojega je red valovito poredanih stanica zbijenih u otočiće od 5-8 stanica (strelice). Ove stanice imaju radijalnu orijentaciju dok su u preostalim dijelovima marginalne zone stanice male i okrugle. Ove male stanice gušće su zbijene oko sredine i u subpijalnom dijelu, gdje se nalaze i velike, intenzivno reaktivne, ovalne stanice,





**Slika 5.126** Majmun E75, rezovi obrađeni imunohistokemijski na GAD67 (A, B) i GAD65 (C) i E83, rezovi obrađeni imunohistokemijski na AChE (D, E). Pravokutnik označen na panelu D uvećano je prikazan kao panel E.

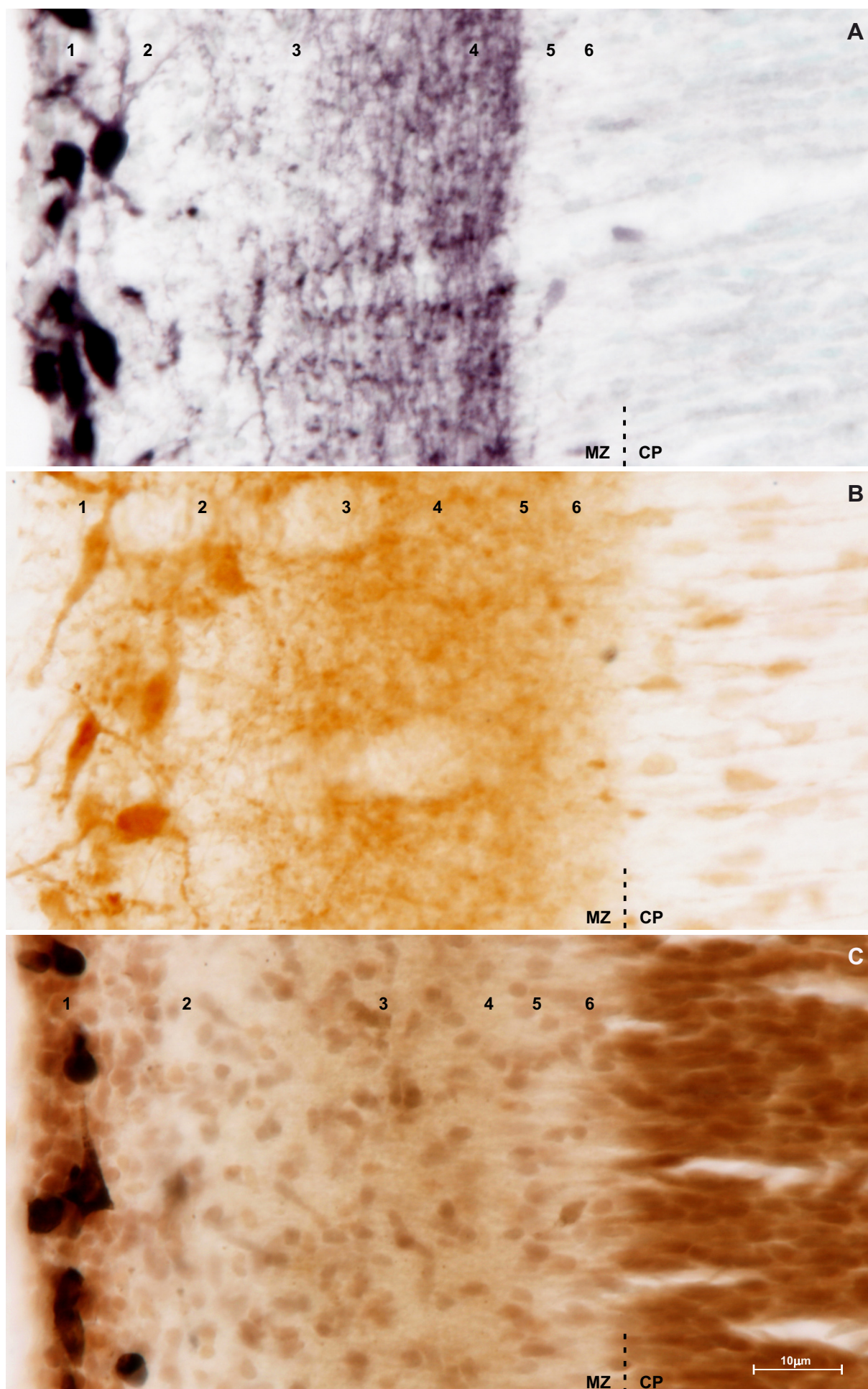
većinom tangencijalno orijentirane, Cajal-Retziusove stanice. Iako se u gornjoj četvrtini i približno jednako širokom podsloju u sredini marginalne zone nalaze gusto zbijene stanice, između ova dva podsloja se također nalaze brojne male zrnate stanice.

**Slika 5.127** Majmun E83, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalbindin (A), kalretinin (B) i AChE (C).

Panel C pokazuje da se marginalna zona u stadiju E83 kod majmuna može podijeliti na sljedeće podslojeve: 1. subpijalni sloj s gusto poredanim znatim stanicama i velikim Cajal-Retziusovim stanicama (stratum subpiale granulare et magnocelulare); 2. proziran sloj s rjeđe distribuiranim malim znatim stanicama (stratum hypocelulare lucidum superficiale); 3. debeli sloj gusto poredanih znatih stanica u središnjem dijelu marginalne zone (stratum granulare); 4. proziran dio marginalne zone koji sadrži gusto poredane horizontalno postavljene aksone s malo stanica (stratum hypocelulare fibrilare ); 5. jedan sloj znatih, piriformnih stanica koje su grupirane u otočiće (stratum granulare profundus); 6. tanak proziran sloj u kojem se vide pojedinačne stanice koje se odvajaju od kortikalne ploče (stratum lucidum profundus).

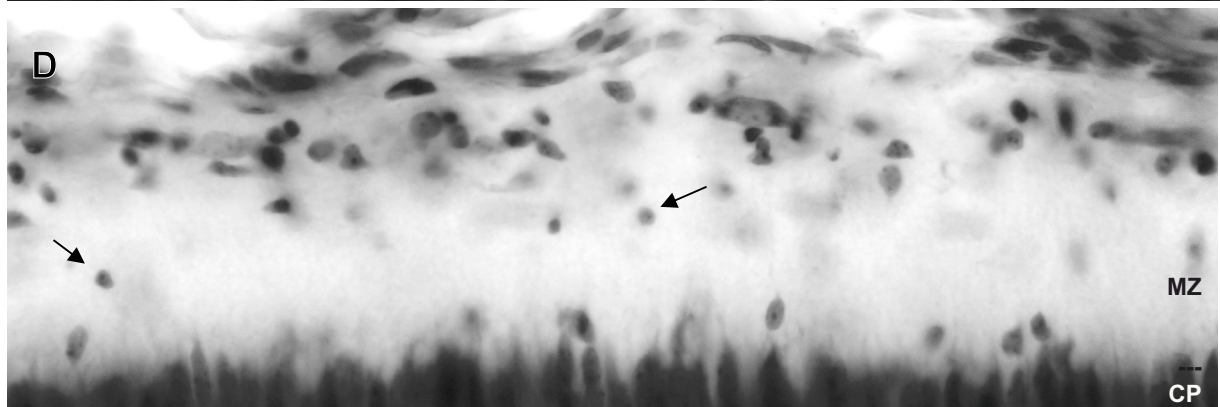
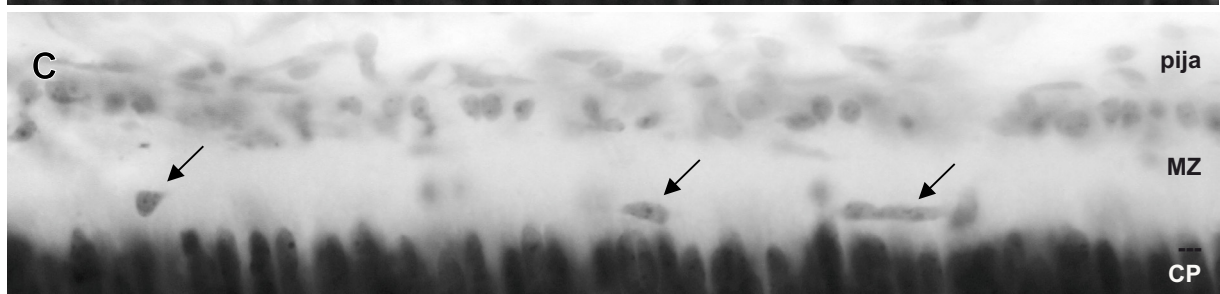
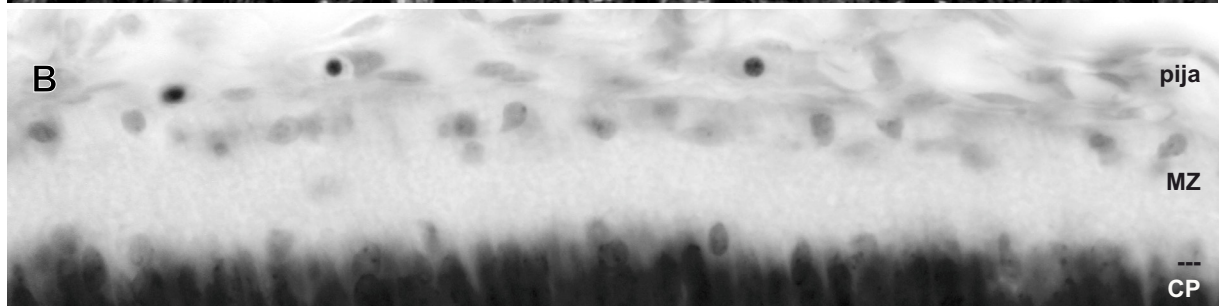
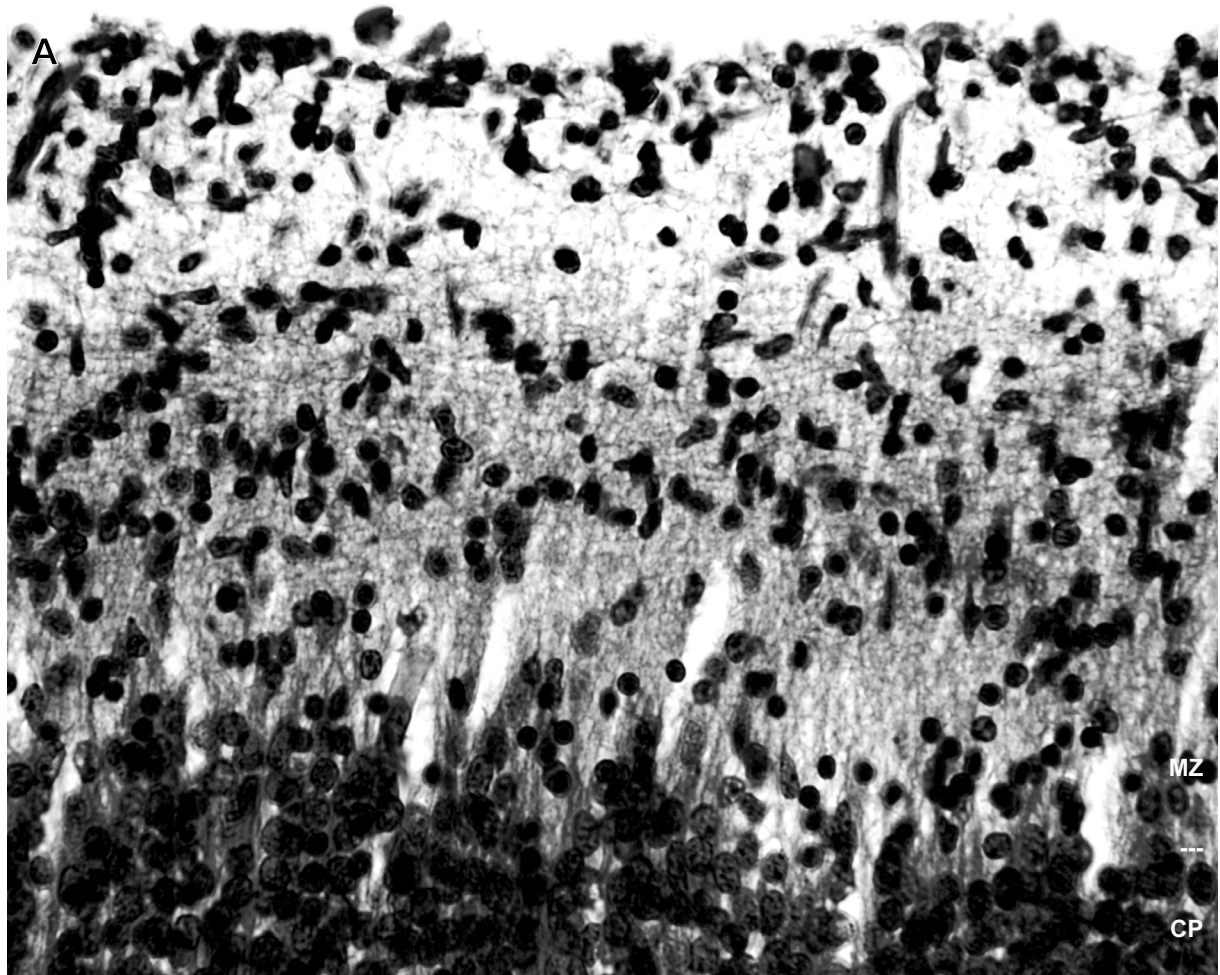
Gusto poredane Cajal-Retziusove stanice reaktivne su na sva tri biljega te je dojam kako sve subpijalno smještene velike stanice izražavaju sva tri biljega. Horizontalna kalbindin reaktivna vlakna vidljiva su u dubokoj trećini marginalne zone, kao i kalretininska. Za razliku od kalbindina, kalretininska reaktivnost vidljiva je u tijelima stanica granularnog sloja u središnjoj trećini marginalne zone.



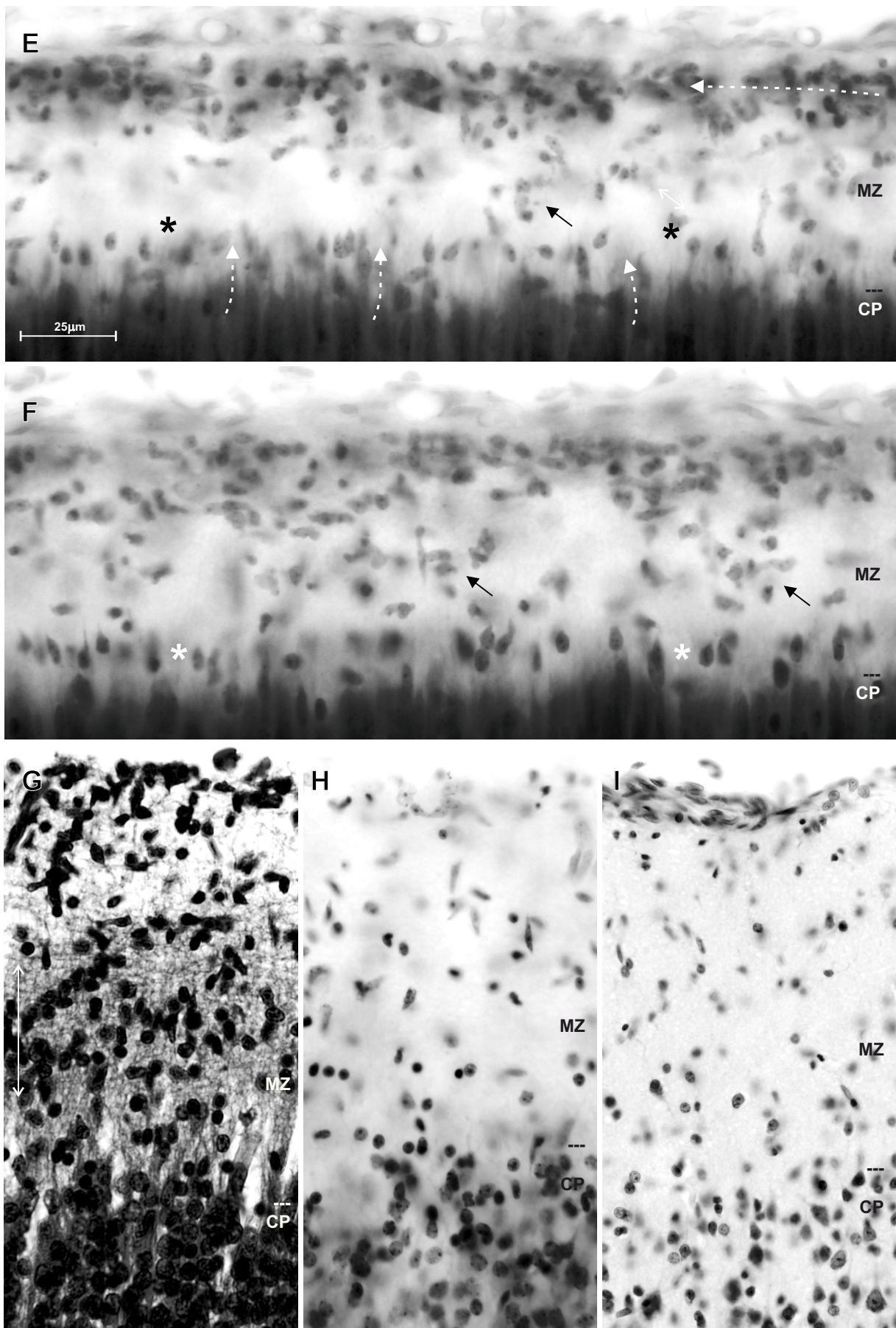


**Slika 5.127** Majmun E83, rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalbindin (A), kalretinin (B) i AChE (C).









**Slika 5.128** Fetus čovjeka star 20 (A, G), 8,5 (B), 10 (C), 13 (D), 15 (E) i 17 tjedana (F), novorođenče (H) i 18 mjesечно dijete (I), rezovi obojeni Nissl metodom.

**Slika 5.128** Fetus čovjeka star 20 (A, G), 8,5 (B), 10 (C), 13 (D), 15 (E) i 17 tjedana (F), novorođenče (H) i 18 mjesечно dijete (I), rezovi obojeni Nissl metodom.

Paneli A-F na istom povećanju prikazuju marginalnu zonu, kao i paneli G-I. Najsloženiju strukturu marginalna zona ima sredinom trudnoće (A, G), kada pokazuje jasnu šesteroslojnu sublaminaciju. Broj stanica po jedinici površine u ovom je razdoblju daleko najveći te se kroz dva prethodna tjedna najmanje utrostručio. Ovdje treba uzeti u obzir i povećanje površine korteksa, koje se u ovom razdoblju gotovo udvostručuje. Ovo upućuju da se u fetusa između 16. i 20. tjedna pet puta povećava ukupan broj stanica u marginalnoj zoni. U novorođenačkoj dobi (H), kao i kasnije tijekom djetinjstva (I), broj stanica po jedinici površine je manji. Sama veličina stanica je manja, što ukazuje kako se najvjerojatnije radi o glija stanicama.

Do početka srednjeg fetalnog razdoblja stanice u marginalnoj zoni većinom su smještene subpijalno (B-D). Ovaj sloj jasno je izražen već na početku ranog fetalnog razdoblja (B), a sa 10 tjedana postaje jasan kontinuiran sloj (C). U dubini marginalne zone, ali jasno odvojene od kortikalne ploče, jasno su vidljive i relativno velike pojedinačne stanice (strelice, C). U srednjem fetalnom razdoblju oblikuje se kontinuirani red pravilno razmaknutih stanica s nastavkom orijentiranim prema piji (zvjezdica, E i F). Ovakva orijentacija stanica ukazuje da one dolaze iz kortikalne ploče ili nastaju odvajanjem gornjeg sloja kortikalne ploče, dok subpijalno orijentirane stanice tangencijalno migriraju kroz marginalnu zonu (isprekidane strelice, E).

U 13. tjednu, kada je marginalna zona dvostruko deblja nego početkom fetalnog razdoblja, mogu se zamijetiti prve pojedinačne stanice u sredini marginalne zone (strelica, D). Tijekom srednjeg fetalnog razdoblja može se zamijetiti stvaranje nakupina stanica u sredini marginalne zone (strelica, E i F) koje sredinom trudnoće oblikuju sloj nepravilne debljine (5-10 redova stanica) smješten u sredini marginalne zone (dvostruka strelica, G). Zanimljivo je kako Nissl bojenje ukazuje da je ovaj sloj smješten u donjem dijelu fibrilarne zone koja obuhvaća središnju trećinu marginalne zone. Između 17. (F) i 20. tjedna (A, G) dolazi do zadebljanja marginalne zone.

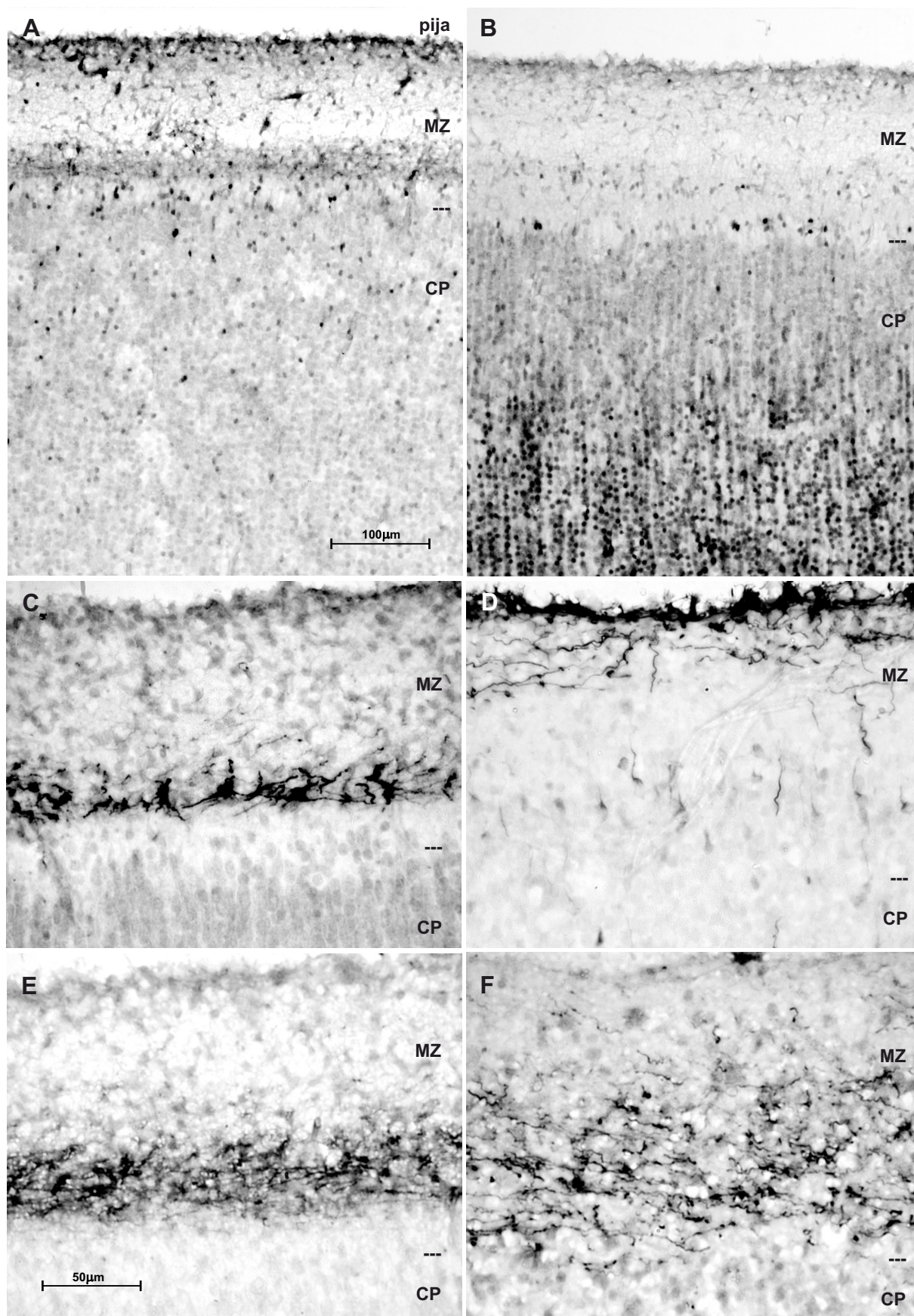
Ovi podaci ukazuju da marginalna zona predstavlja važan put migracije kojim u korteks dolazi sve veći broj stanica do sredine trudnoće. Broj migrirajućih stanica intenzivno se povećava između 15. i 20. tjedna (E-G). U ranom fetalnom razdoblju polako se povećava broj stanica koje putuju pretežito subpijalno, da bi početkom srednjeg fetalnog razdoblja ove stanice činile podsloj od 3-5 redova gusto zbijenih stanica. Prema sredini trudnoće dolazi do naglog povećanja broja stanica koje putuju kroz marginalnu zonu jer se u tom razdoblju marginalna zona dodatno zadebljava, a u njoj sredini se stvara jednako debeli sloj gusto poredanih stanica. Uzevši u obzir i povećanje površine telencefalona, jasno je da se broj migrirajućih stanica izrazito povećava.



**Slika 5.129** Fetus čovjeka star 20 tjedna (A-D), 30 tjedana (E) i novorođenče (F), rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalretinin (A), NeuN (B), SMI312 (C, E, F) i MAP2 (D).

Paneli prikazuju marginalnu zonu. Vidljiv je gradijent povećanja gustoće kalretininskih stanica od sredine prema gornjem dijelu kortikalne ploče te je njihova gustoća najveća u marginalnoj zoni (A). Kalretininske stanice u marginalnoj zoni čine sloj intenzivno reaktivnih stanica smješten neposredno subpijalno, no brojne kalretininske stanice distribuirane su i u donjoj polovici marginalne zone. NeuN reaktivnost (B) pokazuje kako postoji smanjenje gradijenta reaktivnosti od dubine prema površini kortikalne ploče, što je i očekivano s obzirom da se NeuN počinje izražavati tek u stanicama koje su se počele diferencirati. U marginalnoj zoni samo manji broj stanica pokazuje NeuN reaktivnost, što ukazuje kako je manji broj stanica marginalne zone ušao u proces diferencijacije. Cajal-Retziusove stanice nisu NeuN reaktivne te niti u odmaklom stupnju diferencijacije ne izražavaju NeuN. Najviše intenzivno NeuN reaktivnih stanica smješteno je na najdonjem dijelu marginalne zone (B), što pokazuje da ovaj podsloj ne nastaje od novopridošlih stanica kortikalne ploče, niti je sastavljen od migratornih stanica koje dominiraju u marginalnoj zoni.

SMI312 reaktivnost prisutna je sredinom trudnoće u središnjem dijelu marginalne zone i preklapa se sa širokim podslojem gusto poredanih stanica (C). U tom razdoblju reaktivnost je prisutna u širokim horizontalno i koso orijentiranim nastavcima, ali dominiraju masivne tvorbe trokutastog oblika. Moguće je da se radi o spletovima aksona, ali također i o proširenjima samog aksona. Po završetku kasnog fetalnog razdoblja (E), zona SMI312 reaktivnosti je vrlo gusta te se proširila i zahvaća donju trećinu marginalne zone. Veći broj vlakana je reaktivan, ali su tanja nego u prethodnom stadiju, a nakupine aksona su daleko manje i rjeđe postavljene. Kod novorođenčeta (F) SMI312 reaktivan splet je rjeđi, ali se proteže kroz cjelokupnu donju polovicu marginalne zone. Vlakna su većinom tanja, iako je debljina dosta varijabilna te se vide ovalna proširenja pojedinih nastavaka. MAP2 reaktivnost sredinom trudnoće (D) vidljiva je u zoni intenzivne SMI312 reaktivnosti (C), no samo u početnom dijelu nastavaka stanica orijentiranih prema piji. Intenzivna MAP2 reaktivnost nastavaka prisutna je u površnom dijelu marginalne zone i najvjerojatnije odgovara diferenciranim Cajal-Retziusovim stanicama.



**Slika 5.129** Fetus čovjeka star 20 tjedna (A-D), 30 tjedana (E) i novorođenče (F), rezovi obrađeni imunohistokemijski na kalretinin (A), NeuN (B), SMI312 (C, E, F) i MAP2 (D).

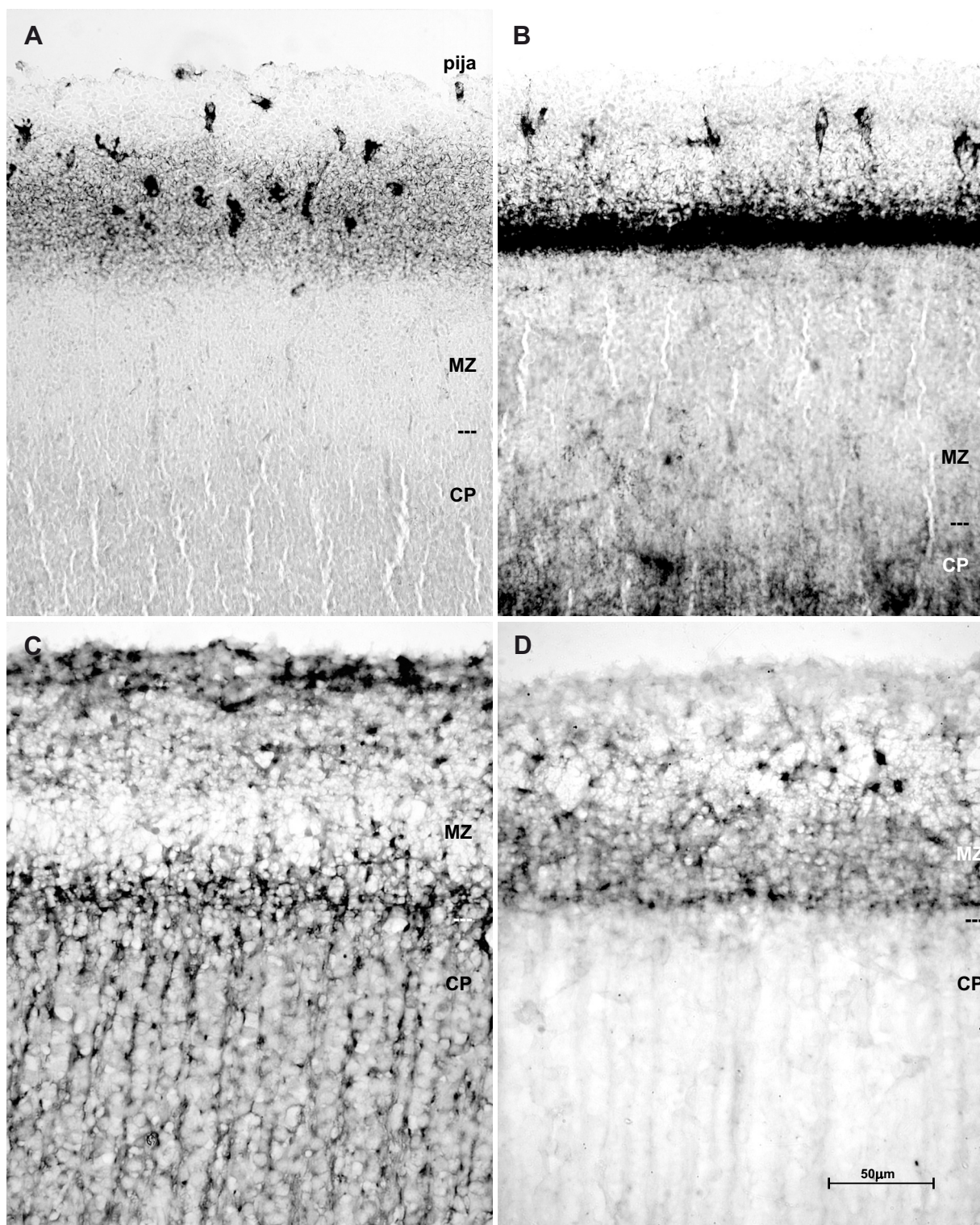


**Slika 5.130** Fetus čovjeka star 17 (A) i 28 (B) tjedana, rezovi histokemijski obojeni na AChE (A, B) i 21 tjedan, rezovi obrađeni imunohistokemijski na MAP1B (C) i SMI81 (D).

Paneli prikazuju marginalnu zonu. U srednjem fetalnom razdoblju AChE reaktivne stanice distribuirane su kroz gornju trećinu marginalne zone, dok je blaga reaktivnost neuropila prisutna kroz gornju polovicu marginalne zone, izuzev samog subpijalnog dijela (A). Krajem kasnog fetalnog razdoblja intenzivno reaktivna, relativno široka zona vidljiva je u donjem dijelu gornje trećine marginalne zone (B). AChE reaktivne stanice distribuirane su subpijalno te su veće i djeluju diferenciranije nego krajem srednjeg fetalnog razdoblja (B). Ovakav obrazac reaktivnosti ukazuje na diferencijaciju i maturaciju Cajal-Retziusovih stanica i njihovih horizontalnih projekcija kroz površni dio marginalne zone.

Sredinom trudnoće, MAP1B reaktivnost (C) vidljiva je u najdonjem dijelu marginalne zone koji odgovara sloju intenzivno reaktivnih NeuN stanica (slika 5.129B). Ovo ukazuje kako se već sredinom trudnoće u najdonjem dijelu marginalne zone nalaze relativno maturirani neuroni, čemu u prilog govori i najintenzivnija SMI81 reaktivnost koja pokazuje maturaciju presinaptičkih završetaka ovog dijela marginalne zone (D). Nešto blaža SMI81 reaktivnost prisutna je i kroz ostatak donje polovice marginalne zone.

Podaci navedeni na slikama 5.128, 5.129 i 5.130 jasno ukazuju na razvojnu i funkcionalnu različitost gornjeg i donjeg dijela marginalne zone, uključujući i porijeklo snopova migratornih neurona.



**Slika 5.130** Fetus čovjeka star 17 (A) i 28 (B) tjedana, rezovi histokemijski obojeni na AChE i 21 tjedan, rezovi obrađeni imunohistokemijski na MAP1b (C) i SMI81 (D).



#### **5.3.4 Produžena proliferacija GABA-ergičkih neurona u majmuna i čovjeka**

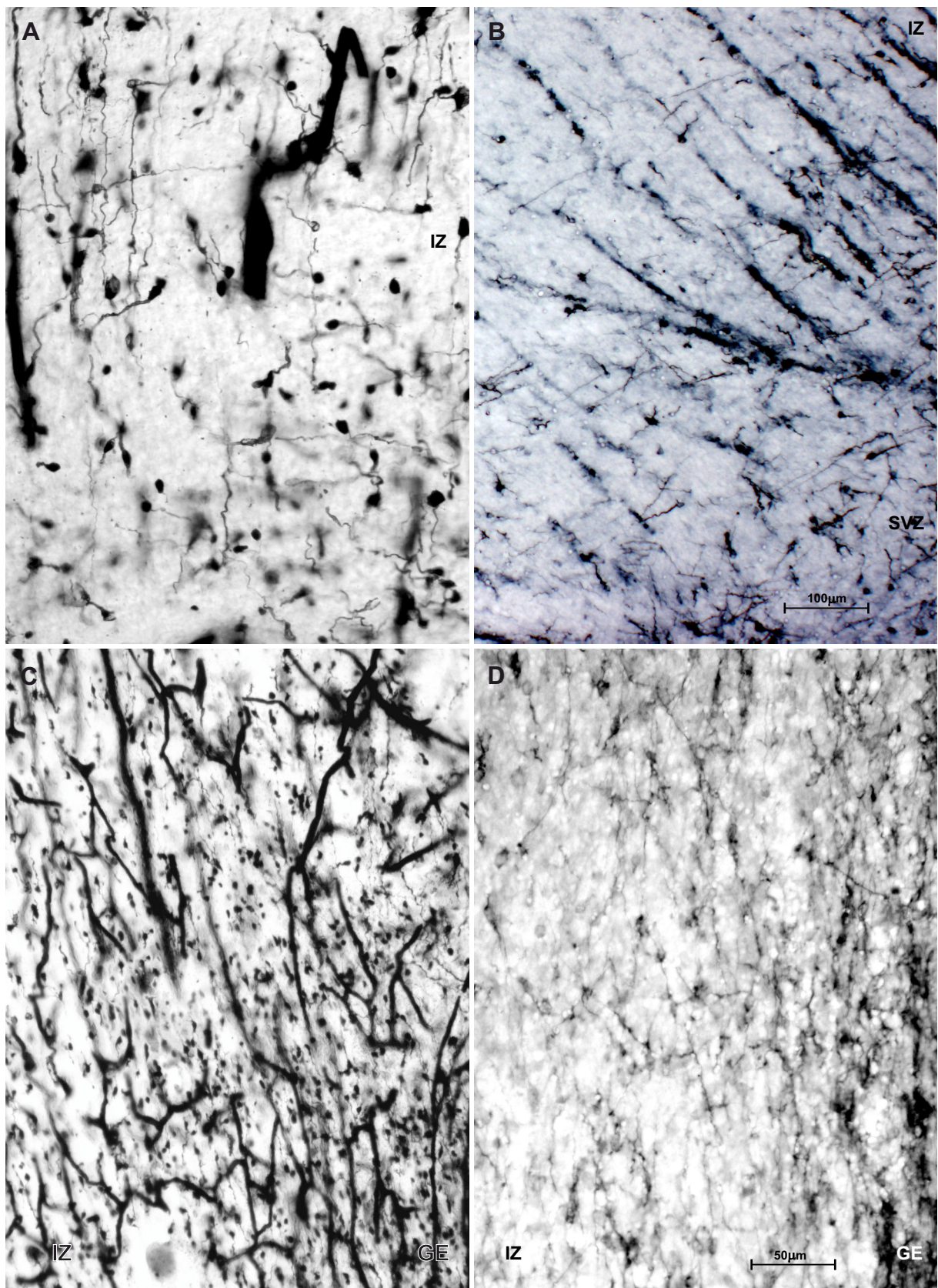
U ovoj studiji nije istraženo koliko dugo marginalna zona ostaje masivan put migracije, ali je sigurno da u novorođenačkoj dobi (slika 5.128H), kao i kasnije tijekom života (slika 5.128I), nema tako velikog broja stanica unutar ove zone. Međutim, kroz cijelu drugu polovicu trudnoće u telencefalonu čovjeka vidljive su brojne tangencijalno i neradijalno orijentirane unipolarne stanice (slika 5.131A i 5.131B), bez značajnog smanjivanja gustoće kroz posljednje tromjesečje trudnoće. Vidljivo je također da krajem drugog tromjesečja (slika 5.131C) nema značajnog smanjenja broja stanica koje napuštaju ganglijski brežuljak, a brojne MAP2 pozitivne stanice vidljive su oko ostataka ganglijskog brežuljka i krajem trudnoće (slika 5.131D). Ovi podaci upućuju na značajno stvaranje GABA-ergičkih neurona tijekom posljednjeg tromjesečja trudnoće, a u tom slučaju bi marginalna zona mogla predstavljati najvažniji put njihove migracije. Ovi podaci potkrijepljeni su i produženim prisustvom GABA-ergičkih progenitora i brojnošću GABA pozitivnih migratornih neurona u majmuna u posljednjem tromjesjeću (slika 5.117E-G).

**Slika 5.131** Fetus čovjeka star 24 tjedna, Golgi impregnirani rezovi (A, C) i 35 tjedana, rezovi obrađeni imunohistokemijski na MAP2 (B, D).

Kroz cijelu drugu polovicu trudnoće vidljive su brojne tangencijalno i neradijalno orijentirane unipolarne stanice (A, B), bez značajnog smanjivanja gustoće kroz posljednje tromjesečje trudnoće. Vidljivo je također da krajem drugog tromjesečja (C) nema značajnog smanjenja broja stanica koje napuštaju ganglijski brežuljak, a brojne MAP2 pozitivne stanice vidljive su oko ostataka ganglijskog brežuljka i krajem trudnoće (D).

Ovi podaci upućuju na značajno stvaranje GABA-ergičkih neurona tijekom posljednjeg tromjesečja trudnoće.





**Slika 5.131** Fetus čovjeka star 24 tjedna, Golgi impregnirani rezovi (A, C) i 35 tjedana, rezovi obrađeni imunohistokemijski na MAP2 (B, D).





## 6. RASPRAVA

### 6.1 METODOLOŠKI OSVRT NA ISTRAŽIVANJE

Cilj rada bio je opisati promjene morfoloških i kemijskih obilježja tangencijalno migrirajućih stanica telencefalona te promjene njihove distribucije u majmuna i čovjeka tijekom prve polovice trudnoće, s posebnim osvrtom na medijalni zid. Tijekom istraživanja analiziran je već obrađeni materijal majmunskog tkiva iz kolekcije dr. Monique Esclapez koji uključuje tkivo i histološki obrađen materijal dr. Brigitte Berger (Berger i sur., 1993, Berger i Alvarez, 1996), a dodatno su imunohistokemijski obrađeni i rezovi smrznutih blokova moždanog tkiva. Osim majmunskog, analiziran je i postmortalni materijal ljudskih fetusa iz Zagrebačke neuroembriološke zbirke (Kostović i sur., 1991, Judaš i sur., 2011). Ove histološke zbirke mozгова fetusa majmuna i čovjeka pripadaju zbirkama s najviše primjeraka i najvećim brojem histološki obrađenih rezova, a jedinstvene su po veličini uzorka (brojem primjeraka i rezova) imunohistokemijskim metodama obrađenog majmunskog tkiva i Golgi metodom impregniranog ljudskog tkiva fetusa u prvoj polovici trudnoće. Kako je većina primjeraka serijski obrađena, sustavnom analizom već postojećeg materijala dobivene su nove i jedinstvene spoznaje te predložena nova mjesta stvaranja, kao i pravci kretanja tangencijalno migrirajućih stanica različitih molekularnih obilježja.

Prednost analiziranog materijala bila je i u tome što su imunohistokemijski eksperimenti provedeni korištenjem protokola slobodno-plivajućih rezova koji su nekoliko puta deblji od parafinskih te omogućavaju bolje prodiranje protutijela u tkivo. Na taj način bilo je moguće dobiti kvalitativni pregled broja neurona koji se stvaraju u pojedinim proliferativnim područjima i kreću određenim migratornim putevima te identificirati područja i puteve gdje se nalazi manji broj migratornih neurona.

Ograničavajući čimbenik kod korištenja slobodno-plutajućih rezova je značajno manji broj rezova po mozgu, što je posebno došlo do izražaja u kasnije obrađenom materijalu kada su korišteni rezovi debljine 100-150 $\mu$ m. Najveće ograničenje broja rezova bilo je upravo u najranijim stadijima, posebice u E46 gdje nije bilo moguće razdvojiti hemisfere pa je u ovom mozgu ukupno bilo raspoloživo manje od 100 rezova. Ciljano je za ovo istraživanje imunohistokemijski dodatno obrađeno 200-tinjak rezova. Kako je veliki dio rezova novih blokova izabran za potrebe prethodnog istraživanja (Petanjek i sur., 2008, Petanjek i sur., 2009a, Hladnik i sur., 2014), najveće ograničenje u ovom istraživanju bila je nemogućnost da se na prikladnim razinama provedu ili ponove imunohistokemijski eksperimenti s više protutijela, što može biti jako važno za identificiranje užih puteva migracije i lokaliziranih proliferativnih zona.

### **6.1.1 GAD i Mash1 ekspresija kao biljeg u određivanju zona proliferacije i puteva migracije kortikalnih GABA-ergičkih neurona**

U svrhu identifikacije putova migracije GABA-ergičkih interneurona korištenje dvije izoforme glutamat dekarboksilaze (GAD) pokazalo se iznimno uspješnim budući da GABA-ergički interneuroni već u ranoj fazi, pa čak i u progenitorima, sintetiziraju ovaj enzim (Blum i Mann, 2002, Petanjek i sur., 2009a). Usporedbom gustoće stanica vidljivo je kako u fetalnom razdoblju većina stanica koje napuštaju ganglijski brežuljak već izražava GAD, a isto je i sa stanicama ganglijskog brežuljka. Do sada je ekspresija GAD-a u stanicama koje ne sintetiziraju GABA-u pokazana u znatim stanicama girusa dentatusa (Sloviter, 2003) pa se GAD ekspresija može smatrati vrlo pouzdanim biljekom GABA-ergičkih neurona i njihovih progenitora te se na temelju distribucije GAD pozitivnih stanica može donijeti jasan zaključak o mjestu porijekla i putovima migracije GABA-ergičkih neurona.

Prilikom identifikacije zona stvaranja GABA-ergičkih neurona, u ovoj studiji je korišteno protutijelo na transkripcijski faktor Mash1 koji je izražen u progenitorima GABA-ergičkih neurona. Kako je ovo protutijelo pokazalo jasnu i specifičnu reakciju, a podaci iz literature ne ukazuju da bi se GABA-ergički neuroni mogli stvarati u zonama gdje nema Mash1 reaktivnosti, može se zaključiti kako se GABA-ergički neuroni ne stvaraju u proliferativnim zonama u kojima nema Mash1 reaktivnosti. Međutim, Mash1 reaktivnosti nije u potpunosti specifična za progenitore GABA-ergičkih neurona. Kako je Mash1 reaktivnost u progenitorima vezana uz njihovu migraciju, prisutna je i u progenitorima znatih stanica dentatusa, ali i u palijalnim progenitorima koji tijekom ranog fetalnog razdoblja migriraju i formiraju subventrikularnu zonu. Iako je moguće jasno odvojiti ekspresiju u ovim progenitorima od GABA-ergičkih progenitora, to nije moguće tijekom srednjeg fetalnog razdoblja kada se Mash1 ekspresija može uočiti u palijalnim proliferativnim zonama. U ovom razdoblju započinje i produkcija oligodendroglije koja također izražava Mash1, doduše nešto slabijeg intenziteta. Međutim, u srednjem fetalnom razdoblju se u progenitorima palijuma javlja intenzivna GAD65 reaktivnost, koja u velikom broju kolokalizira s Mash1 reaktivnim stanicama (Petanjek i sur., 2009a, Al-Jaberi i sur., 2013). Stoga se može zaključiti da se na temelju Mash1 ekspresije mogu jasno identificirati zone proliferacije GABA-ergičkih neurona.



### **6.1.2 Identifikacija zona proliferacije i puteva migracije različitih populacija kortikalnih GABA-ergičkih neurona**

Prilikom identifikacije različitih subpopulacija GABA-ergičkih neurona, podaci iz ovog istraživanja ukazali su kako se somatostatin može prikazati već vrlo rano u postmitotičkim neuronima. U ovom istraživanju poteškoća kod somatostatinskog bojenja bila je vezana uz reaktivnost oko krvnih žila, kao i u parenhimu u sloju iznad i ispod kortikalne ploče. Čini se da se ipak ne radi o nespecifičnom bojenju, jer je ekspresija somatostatina u stijenci krvnih žila tijekom razvoja opisana (Ulfig, 2002). Distribucija somatostatinskih neurona ne ukazuje kako bi ona bila vezana uz populacije koje izražavaju neki drugi neurotransmiter.

Drugi glavni biljeg subpopulacije GABA-ergičkih neurona, kalretinin, eksprimiran je u brojnim migratornim stanicama ganglijskog brežuljka, kao i u najmasivnijem migratornom snopu koji ide kroz subventrikularnu zonu. Nejasno je, međutim, pripadaju li male kalretininske stanice smještene subkalozalno u dijelovima gdje nema GAD reaktivnosti populaciji GABA-ergičkih neurona. S obzirom na to da dosadašnji podaci sugeriraju kako rane kalretinin pozitivne Cajal-Retziusove stanice i stanice koje oblikuju primordijalnu kortikalnu ploču ne pripadaju skupini GABA-ergičkih neurona (Meyer, 2010), kalretininske stanice koje dolaze iz koroidnog spleta i graničnih područja proliferativnih zona najvjerojatnije pripadaju ovim dvjema populacijama. Također, kod većine stanica u bazalnom dijelu telencefalona koje izražavaju kalretinin nije se uspjela kolokalizirati GABA te je moguće da se radi o acetilkolinskim pa čak i dopaminskim ili glutamatergičnim neuronima. No u palijumu, kalretininski neuroni su pretežno kolokalizirani s GABA-om, a nikada nije potvrđena kolokalizacija s glutamatom. Također, prolazna ekspresija kalretinina tijekom razvoja ili ekspresija koja se javlja u stanjima koja odstupaju od uobičajenog (primjerice epileptički status) nije do sada opisana te se može pretpostaviti da je u palijumu, osim Cajal-Retziusovih stanica i stanica koje oblikuju primordijalnu kortikalnu ploču, ekspresija kalretinina isključivo vezana uz subpopulaciju GABA-ergičkih neurona.

Kalbindinski GABA-ergički neuroni najčešće se klasificiraju kao dio subpopulacije somatostatinskih neurona (Rogers, 1992, Kubota i Kawaguchi, 1994, Gonchar i Burkhalter, 1997, Kawaguchi i Kubota, 1997, Hladnik i sur., 2014). U ovoj studiji u područjima gdje su vidljivi somatostatinski neuroni uglavnom nema značajnije ekspresije kalbindina, a kalbindin nije značajnije izražen niti u snopu stanica koji iz ganglijskog brežuljka odlazi u subventrikularnu zonu. Stoga je pitanje da li ekspresija kalbindina u subpopulaciji GABA-ergičkih neurona koji sintetiziraju ovaj protein nije prisutna u ranim postmitotičkim neuronima, odnosno moguće je da ovi neuroni izražavaju kalbindin tek po završetku migracije. S druge strane, medijalna stijenka telencefalona sadrži brojne i gusto poredane kalbindin pozitivne stanice, koje pripadaju populaciji ranih Cajal-Retziusovih stanica, znatih stanica dentatusa te

prvih piramidnih stanica hipokampalne ploče. Alokortikalni neuroni koji pokazuju morfologiju piramidnih također pokazuju blagu kalbindinsku reaktivnost. Blaža kalbindinska reaktivnost opisana je u odrasla čovjeka u neokortikalnim neuronima koji odgovaraju populaciji glutamatergičkih, no način bojenja je takav da ih se lako može razdvojiti od populacije GABA-ergičkih interneurona (Džaja i sur., 2014). Također, ekspresija kalbindina u glutamatergičkim neuronima javlja se kod nekih patoloških stanja pa nije isključeno da tijekom razvoja i u palijumu dolazi do prolazne ekspresije kalbindina u ne-GABA-ergičkim neuronima. Uz to, samo mali broj kalbindinskih stanica koje bi mogle odgovarati GABA-ergičkim neuronima mogu se zamijetiti tijekom ranog fetalnog razdoblja u kortikalnoj ploči i drugim fetalnim zonama palijuma te stoga ekspresija kalbindina ne može pružiti podatke o stvaranju i migraciji ove subpopulacije GABA-ergičkih neurona tijekom ranog fetalnog razdoblja.

Parvalbuminska reaktivnost zamijećena je tek krajem srednjeg fetalnog razdoblja u sporadičnim stanicama oko paleokortikanog ventrikula. Dosadašnji podaci pokazuju kako ekspresija parvalbumina započinje tek kada su neuroni pozicionirani na konačnom odredištu (Ulfig, 2002), a ekspresija parvalbumina isključivo je vezana uz subpopulaciju GABA-ergičkih neurona.

Temeljem navedenih podataka može se zaključiti kako ova studija daje pouzdane podatke o putevima migracije tijekom ranog fetalnog razdoblja za dvije od tri glavne populacije kortikalnih GABA-ergičkih neurona, kalretininske i somatostatinske subpopulacije, ali ne i podatke o parvalbuminskoj subpopulaciji.



## **6.2 PORIJEKLO I PUTOVI MIGRACIJE GABA-ergičkih NEURONA TELENCEFALONA**

### **6.2.1 Ganglijski brežuljak je najmasivniji izvor tangencijalno migrirajućih GABA-ergičkih neurona telencefalona: većina ovih neurona putuje u sastavu lateralnog migratornog snopa**

Tijekom svih analiziranih stadija gotovo sve stanice ganglijskog brežuljka pokazivale su visok stupanj GAD65 reaktivnosti. Izražavanje Mash1 reaktivnosti pokazuje kako se radi o proliferativnim stanicama. Osim medijalnog, lateralnog i kaudalnog dijela ganglijskog brežuljka, proliferativne stanice septalnog područja, preoptičkog područja, hipotalamusa te bazalnog dijela ventralnog i dorzalnog talamusa, kao i bazalnog dijela epitalamusa, pokazivale su GAD65 i Mash1 reaktivnost u proliferativnim zonama. Ovdje treba napomenuti kako u ganglijskom i septalnom brežuljku, za razliku od ostalih navedenih bazalnih proliferativnih zona, nema GAD67 reaktivnosti. Iznimku najvjerojatnije predstavlja najmedijalniji dio medijalnog ganglijskog brežuljka.

U području između ganglijskog brežuljka i strijatuma može se na Nissl preparatima uočiti stanična zona koja se u prvom dijelu ranog fetalnog razdoblja proteže u palijum gdje se jasno razaznaje kao sloj iznad subventrikularne zone. Ovaj je sloj prisutan do gornje polovice lateralnoga telencefaličkoga zida. Kasnije tijekom ranog fetalnog razdoblja (nakon 11. tjedna nakon začeća kod čovjeka i E52 kod majmuna) stanice koje se nastavljaju iz ganglijskog brežuljka u palijum stapaju se s gornjim dijelom subventrikularne zone koji se počeo razrjeđivati. Na GAD65 reaktivnim preparatima nije moguće razlikovati sloj koji se nalazi između ganglijskog brežuljka i strijatuma, ali je vidljivo da se masa gusto poredanih unipolarnih migratornih stanica odvaja iz lateralnog dijela ganglijskog brežuljka na granici s palijumom i usmjerava kroz gornji dio subventrikularne zone. Ovi podaci dosta jasno ukazuju da se neuroni u lateralnom migratornom snopu stvaraju u medijalnom i lateralnom, kao i u kaudalnom dijelu ganglijskog brežuljka i kroz gornji dio subventrikularne i donji dio intermedijalne zone dolaze do pripadajućih dijelova kortikalne ploče.

Većina eksperimentalnih podataka ukazuje da je medijalni ganglijski brežuljak u miša glavni izvor kortikalnih GABA-ergičkih neurona, dok je lateralni izvor neurona strijatuma (Wichterle i sur., 2001, Wonders i Anderson, 2006, Butt i sur., 2007, Corbin i sur., 2008, Gelman i Marin, 2010). Deskriptivna analiza dosta jasno ukazuje kako kod majmuna i čovjeka lateralni ganglijski brežuljak značajno sudjeluje u stvaranju budućih kortikalnih GABA-ergičkih neurona. Naime, sa 13 tjedana na Golgi preparatima vidi se masa unipolarnih horizontalnih stanica koja se nalazi između ganglijskog brežuljka i strijatuma te postaje sve gušća od medijalno prema lateralno, gdje stanice odlaze u lateralnu stijenku. Eksperimentalni podaci su kod zec majmuna (Ma i sur., 2012, Hansen i sur., 2013)

pokazali kako sam lateralni ganglijski brežuljak nije izvor kortikalnih GABA-ergičkih neurona te da se, kao i kod glodavaca, većina palijalnih interneurona stvara u medijalnom dijelu. No, oni su pokazali da jedan izolirani dio, dorzalni dio lateralnog ganglijskog brežuljka, daje neurone koji su primarno usmjereni prema korteksu, za razliku od glodavaca gdje se ovi neuroni usmjeravaju u olfaktorni bulbus. U ovoj studiji nije bilo moguće identificirati dorzalni dio lateralnog ganglijskog brežuljka.

Ganglijski brežuljak najvažniji je izvor palijalnih GABA-ergičkih neurona tijekom ranog fetalnog razdoblja i u majmuna i u čovjeka, jer ovi neuroni tvore najveći i najgušće ispunjen snop migratornih stanica, lateralni migratorni snop (engl. *lateral migratory stream*). Treba spomenuti kako se dio stanica usmjerava ventralno, prema lateralnim dijelovima bazalnog telencefalona na mjestu gdje nema kortikalne ploče. Čini se kako su ove stanice usmjerene prema bazalnom telencefalonu kao konačnom odredištu, a ne kao području odakle će se usmjeriti u daljnju migraciju kroz marginalnu zonu ili zonu ispod kortikalne ploče. Naime, u ovom dijelu telencefalona gomilaju se GAD67 pozitivne migratorne stanice koje se usmjeravaju u lateralnu stijenu kroz marginalnu zonu i zonu ispod kortikalne ploče. Međutim, čini se kako samo mali broj stanica koje napuštaju ganglijski brežuljak kroz lateralni snop tijekom migracije počinje izražavati GAD67, tako da migratorne stanice koje izražavaju i GAD67 većinom potječu iz proliferativnih područja izvan ganglijskog brežuljka.

### **6.2.2 Palijalne proliferativne zone postaju važan izvor GABA-ergičkih neurona tijekom srednjeg fetalnog razdoblja**

Dosadašnja istraživanja su pokazala kako u srednjem fetalnom razdoblju u majmuna i čovjeka dolazi do značajnijeg stvaranja GABA-ergičkih neurona u palijalnim proliferativnim zonama (Letinic i sur., 2002, Rakic i Zecevic, 2003b, Petanjek i sur., 2009a, Jakovcevski i sur., 2010, Yu i Zecevic, 2011, Zecevic i sur., 2011, Al-Jaberi i sur., 2013). Palijalna produkcija GABA-ergičkih neurona tijekom prenatalnog razdoblja nije dokazana u glodavaca, iako podaci dobiveni kod lasice pokazuju da bi oko 5% GABA-ergičkih neurona slojeva II i III moglo potjecati od palijalnih progenitora (Anderson i sur., 2002). U štakora je tijekom prvih tjedana postnatalnog života pokazano kako se u subventrikularnoj zoni medijalnog telencefaličkoga zida stvaraju GABA-ergički neuroni koji ulaze u područje cingularnog korteksa (Riccio i sur., 2012). Ekspresija biljega palijalnih i subpalijalnih progenitora primarno govori u prilog kako ove proliferativne stanice dolaze iz kaudalnog dijela ganglijskog brežuljka, a ne da se radi o izvorno palijalnim progenitorima.

Kod majmuna tijekom srednjeg fetalnog razdoblja (po prvi puta primijećeno u E64) javlja se Mash1 ekspresija u neokortikalnim proliferativnim zonama koja se može vezati uz stvaranje GABA-ergičkih neurona. Mash1 ekspresija u dijelu stanica proliferativnih zona



neopalijuma vidljiva je i na samom početku ranog fetanog razdoblja u majmuna E48, ali nestaje kasnije u stadiju E54. Kako u ovom razdoblju nema GAD ekspresije u proliferativnim stanicama palijuma, Mash1 ekspresija u neopalijalnim progenitorima tijekom ranog fetalnog razdoblja je najvjerojatnije vezana uz formiranje subventrikularne zone. U miša je u stadiju kada započinje formiranje subventrikularne zone (E12,5) prisutna Mash1 ekspresija u većini palijalnih progenitora (Guillemot i Joyner, 1993), no kasnije tijekom prenatalnog razdoblja dolazi do gubitka reaktivnosti u proliferativnim zonama.

Zanimljivo je da kod čovjeka već tijekom ranog fetalnog razdoblja (8. do 12. tjedan nakon začeća) brojni progenitori palijalnih proliferativnih zona frontalnog režnja izražavaju Mash1 (Ascl1) i GAD što ukazuje da ove stanice stvaraju GABA-ergičke neurone (Al-Jaberi i sur., 2013). U ovoj studiji u ranom fetalnom razdoblju kod majmuna nije zabilježena ovakva reaktivnost, što ukazuje kako je palijalna produkcija GABA-ergičkih neurona u frontalnim dijelovima kore velikoga mozga čovjeka prisutna u ranijem stadiju nego kod majmuna.

U srednjem fetalnom razdoblju kod majmuna (E64-E75) sve stanice palijalne ventrikularne zone pokazuju intenzivnu GAD65 reaktivnost koja je istovjetna obrascu bojenja u ganglijskom brežuljku. Ove okrugle GAD65 pozitivne stanice ventrikularne zone izražavaju i Mash1, što snažno podupire zaključak da se radi o progenitorima GABA-ergičkih neurona. Iako na ljudskom materijalu nije učinjena imunohistokemijska analiza, način Nissl bojenja također podupire zaključak da ventrikularna zona palijuma tijekom srednjeg fetalnog razdoblja postaje zona stvaranja isključivo GABA-ergičkih neurona. GAD65/Mash1 pozitivne stanice iste morfologije, često u nakupinama, vidljive su u ovom stadiju i kroz subventrikularnu zonu. U literaturi postoje podaci koji pokazuju kako GABA ima ulogu u regulaciji proliferacije neuralnih progenitora (Varju i sur., 2001), no s obzirom na intenzitet GAD reaktivnosti i istovremenu ekspresiju Mash1 u većini stanica teško je vjerovati kako se radi o ekspresiji koja nije vezana uz produkciju GABA-ergičkih neurona. Isto tako, za razliku od prijašnjih interpretacija kako se u palijumu većina GABA-ergičkih neurona stvara u vanjskoj subventrikularnoj zoni, rezultati ovog istraživanja više ukazuju na ventrikularnu zonu kao glavni izvor GABA-ergičkih neurona stvorenih u palijumu.

Pitanje proporcije GABA-ergičkih neurona koji se stvaraju u palijalnim proliferativnim zonama još je uvijek kontroverza. Otkrićem palijalne produkcije (Letinic i sur., 2002) pretpostavilo se kako se više GABA-ergičkih kortikalnih neurona kod čovjeka stvara u palijalnim proliferativnim zonama nego u ganglijskom brežuljku. S druge strane, neki autori nisu uspjeli potvrditi prisutnost GABA-ergičkih progenitora u palijalnim proliferativnim zonama (Hansen i sur., 2013, Ma i sur., 2013), iako nisu u potpunosti isključili mogućnost da se manji dio GABA-ergičkih neurona stvara ovdje. Rezultati ovog rada, kao i prethodne evaluacije ovog problema (Hladnik i sur., 2014), jasno su pokazali da tijekom srednjeg fetalnog razdoblja palijalne proliferativne zone postaju značajan izvor kortikalnih GABA-ergičkih

neurona. Iako nije učinjena kvantitativna analiza, potencijalni GAD pozitivni progenitori u palijalnim proliferativnim zonama, povećanje ganglijskog brežuljka i tangencijalno migrirajuće stanice koje odlaze u palijum ne podupiru stav da se većina GABA-ergičkih neurona stvara u palijalnim proliferativnim zonama čak niti tijekom srednjeg fetalnog razdoblja. Procjena je kako bi se oko 20% kortikalnih GABA-ergičkih neurona moglo stvarati u palijumu, ali da postoje i velike regionalne razlike. Tako bi za frontalni režanj palijalne proliferativne zone bile glavni izvor GABA-ergičkih neurona, dok bi za ostale režnjeve to mogao biti kaudalni dio ganglijskog brežuljka.

### **6.2.3 Septalne proliferativne zone kao izvor GABA-ergičkih neurona koji migriraju kroz marginalnu zonu**

U području septuma, reaktivnost proliferativnih zona istovjetna je reaktivnosti u ganglijskom brežuljku te proliferativne stanice izražavaju GAD65 i Mash1, ali ne i GAD67. Septalne proliferativne zone izvor su GABA-ergičkih neurona za strukture medio-bazalnog telencefalona, ali koliko pridonose produkciji GABA-ergičkih neurona za korteks i hipokampus nije jasno. Zbog svog anatomskeg smještaja moglo bi se očekivati da septum stvara GABA-ergičke neurone koji migriraju prema dorzalno i ulaze u područje najrostralnijeg dijela (dorzalnog) hipokampusa, susjedna mezokortikalna područja kao i medio-bazalne dijelove neokorteksa frontalnog režnja. Iako su ovi pravci migracije očekivani s anatomskeg aspekta, oni do sada nisu opisani u literaturi. U okviru ovoga istraživanja također nisu pronađeni jasni znakovi masivne migracije u ventralne i dorzalne dijelove susjednih kortikalnih područja.

Međutim, masa GAD65 reaktivnih migratornih stanica gomila se na palijalnoj površini i usmjerava kroz marginalnu zonu prema ventralnim i dorzalnim dijelovima korteksa. Rostralno od samog septuma može se u jednom lokalnom području već u E48 uočiti i masa GAD67 reaktivnih stanica. Čini se kako ove stanice dolaze s ruba rostralnog dijela septalnog područja, odnosno medijalnog zida u kojemu proliferativne stanice izražavaju i GAD67, a ne samo GAD65.

Iako je marginalna zona tijekom ranog fetalnog razdoblja, a i kasnije, ispunjena GAD67 reaktivnim malim migratornim stanicama, na granici marginalne zone i kortikalne ploče gdje nisu prisutne GAD67 pozitivne migratorne stanice vidi se gusti snop migratornih GAD65 reaktivnih stanica. To govori u prilog da kroz marginalnu zonu migriraju budući GABA-ergičkih neuroni koji dolaze iz proliferativnih zona koje izražavaju samo GAD65 te se septalno područje čini najizglednijim kao područje stvaranja ovih neurona.



#### **6.2.4 GAD67 reaktivne proliferativne zone telencefalona kao izvor GABA-ergičkih neurona koji migriraju kroz marginalnu zonu i zonu ispod kortikalne ploče**

Za razliku od ganglijskog brežuljka i septuma u kojima proliferativne stanice izražavaju samo GAD65 reaktivnost, u dijelu proliferativnih zona prvenstveno onih vezanih uz medijalni telencefalički zid, stanice izražavaju i GAD67.

Visoka ekspresija GAD65 izoforme u proliferativnim i migratornim stanicama tumačio se činjenicom kako je ovaj oblik GAD-a u većini odraslih neurona smješten u aksonskim terminalima pa se najvjerojatnije zato jače izražava ranije od GAD67 varijante, koja će više biti distribuirana u samom tijelu (Petanjek i sur., 2008, Petanjek i sur., 2009a, Petanjek i sur., 2009b).

U ovoj je studiji po prvi puta pokazano da se, prema stupnju ekspresije GAD izoformi, razlikuju dvije subpopulacije migratornih GABA-ergičkih neurona i njihovih progenitora. U proliferativnim zonama ganglijskog brežuljka, septuma (septalni brežuljak) i najvjerojatnije dijela preoptičkog područja gotovo sve stanice izražavaju samo GAD65 izoformu. One imaju specifični okrugli oblik i ujedno izražavaju i Mash1. Mash 1 reaktivnost polako slabi u jednom vanjskom dijelu iznad subventrikularne zone što najvjerojatnije označava zonu migracije novostvorenih GABA-ergičkih neurona koji započinjanjem migracije smanjuju Mash1 ekspresiju. Vidljivo je da dio ovih novostvorenih neurona, osim migracije u lateralni migratorni snop, migrira i prema strijatumu i prema bazalnom telencefalonu te septalnim strukturama, a iz septuma većina neurona odlazi u marginalnu zonu.

Stanice koje tijekom migracije izražavaju samo GAD65 čine se jasno odvojene od stanica koje izražavaju i GAD67. Ove migratorne stanice i njihovi progenitori su tijekom ranog fetalnog razdoblja smještene oko proliferativnih zona u dorzalnom dijelu medijalnog zida rostralnog telencefalona neposredno ispred kalozalne ploče te kaudalnom dijelu medijalnog telencefaličkog zida gdje se proteže sve do ganglijskog brežuljka. Čini se također da se ova reaktivnost proteže u najmedijalniji dio ganglijskog brežuljka na mjestu prelaska medijalnog u kaudalni dio. Također, u najrostralnijem dijelu na spoju medijalnog i lateralnog brežuljka također je vidljiva GAD67 reaktivnost, a nejasno je proteže li se ova reaktivnost prema medijalnom zidu. Može se pretpostaviti da ova zona predstavlja rostralni dio ganglijskog brežuljka i kroz vrh frontalnog roga prelazi prema najrostralnijem dijelu septalnog brežuljka.

Čini se da GAD67 reaktivni progenitori i migratorne stanice većim dijelom izražavaju i GAD65, iako je kvalitativni dojam kako je ta reaktivnost manja nego u stanicama koje samo izražavaju GAD65. Različiti stupanj ekspresije dvije GAD izoforme u progenitorima i migratornim stanicama različitih područja ne može se objasniti evolucijskim razlozima, jer su se ove dvije GAD izoforme pojavile paralelno (Lariviere i sur., 2002). Dosadašnje studije koje

su istraživale kolokalizaciju ova dva enzima uglavnom su pokazale kako 85% diferenciranih GABA-ergičkih neurona u središnjem živčanom sustavu sintetizira oba enzima. Također, iako određene populacije imaju tendenciju značajno većem stupnju sinteze jedne od ove dvije izoforme, ipak kod većine neurona nema jače izraženih razlika. Stupanj izražavanja različitih GAD izoformi nije regionalno specifičan, već su ove razlike prisutne unutar različitih populacija u istom području. U područjima gdje dolazi do ekspresije GAD u proliferativnim stanicama, neovisno o izoformi koju izražavaju, u jednakoj je mjeri prisutna Mash1 reaktivnost. Zbog toga smatram kako razlike u ekspresiji, prvenstveno GAD67 izoforme, u proliferativnim i migratornim stanicama nisu vezane uz razinu ekspresije ove dvije izoforme kod diferenciranih neurona.

Za razliku od migratornih stanica koje izražavaju samo GAD65 i koje na lateralnom rubu ganglijskog brežuljka ulaze u donji dio intermedijalne zone palijuma te formiraju lateralni migratorni snop, GAD67 reaktivne migratorne stanice usmjerene su prema medijalnom dijelu bazalnog telencefalona gdje se nagomilavaju te se zatim usmjeravaju u lateralni telencefalon podijelivši se u snop koji ulazi u marginalnu zonu i snop neposredno ispod kortikalne ploče. Ovi podaci ukazuju da se GAD67 reaktivne migratorne stanice stvaraju u odvojenim proliferativnim područjima i koriste različite puteve migracije od migratornih stanica koje izražavaju samo GAD65. Iz GAD67 reaktivnih proliferativnih zona vidljiv je snop somatostatin reaktivnih stanica koji se usmjerava prema medijalno i bazalno, a zatim kroz marginalnu zonu i zonu ispod kortikalne ploče ulaze u palijum. Međutim, gustoća GAD67 pozitivnih stanica daleko je veća od somatostatinskih, tako da se ne može isključiti da tijekom ranog fetalnog razdoblja i druge populacije nastaju u ovim područjima. Moguće je i da somatostatin još nije izražen u svim migratornim stanicama. S druge strane, istovjetnu distribuciju i gustoću kao migratorne stanice koje izražavaju samo GAD65 tijekom ranog fetalnog razdoblja imaju kalretininske stanice.

Somatostatinski neuroni su najranija populacija GABA-ergičkih neurona hipokampusa (Bakst i sur., 1985, Berger i sur., 1993). Kako ovi neuroni prvi ulaze u područje ventralnog hipokampusa, čini se kako su proliferativne zone u kaudalnom dijelu medijalnog telencefaličkoga zida najizglednije mjesto gdje se tijekom ranog fetalnog razdoblja stvaraju prvi GABA-ergički neuroni hipokampusa.

### **6.2.5 Diencefaličke proliferativne zone kao izvor GABA-ergičkih neurona telencefalona**

Tijekom ranog i srednjeg fetalnog razdoblja u dijelovima proliferativnih zona diencefalona mogu se uočiti područja intenzivne GAD i Mash1 reaktivnost. U ovim područjima prisutna je intenzivna ekspresija GAD67, iako je vidljiva i ekspresija GAD65. Gusta i jaka ekspresija obje izoforme GAD-a prisutna je u gotovo cjelokupnoj proliferativnoj



zoni hipotalamusa, ali i dalje kroz hipotalamus u bazalni telencefalon. Vidljive su još dvije veće proliferativne zone koje pokazuju GAD67/Mash1 reaktivnost, a nalaze se u talamusu i odgovaraju ventralnom dijelu ventalnog i dorzalnog talamusa. Manja zona reaktivnosti vidljiva je i u ventralnom dijelu epitalamusa. U ovim zonama GAD65 reaktivnost je slabije izražena nego reaktivnost na GAD67.

Od talamičkih proliferativnih zona jasno se vide stanice koje migriraju u talamus. Zanimljivo je kako je manji dio stanica tangencijalno orijentiran, dok ostale putuju u radialnom smjeru. To je posebno izraženo kod stanica retikularne jezgre, koje se gomilaju na lateralnom dijelu talamusa. Moguće je da i dio stanica periretikularne jezgre dolazi iz talamičkih proliferativnih zona. Distribucija stanica periretikularne jezgre ukazuje kako se one jednim dijelom usmjeravaju prema lateralnom migratornom snopu. Ove stanice izražavaju kalretinin, a deskriptivni podaci dosta jasno govore u prilog tome da velik dio ovih stanica dolazi iz proliferativne zone koja okružuje vrh temporalnog roga lateralnih klijetki.

Na analiziranom materijalu moglo se uočiti i gangliotalamičko tijelo koje oblikuju neuroni koji iz ganglijskog brežuljka putuju u talamus. Gangliotalamičko tijelo uočeno je već tijekom ranog fetalnog razdoblja, kako u čovjeka, tako i u majmuna. Ovo je prvi opis gangliotalamičkoga tijela u majmuna, a do sada se smatralo kao je to embrionalna struktura svojstvena čovjeku, iako postoji podatak o tome kako u majmuna ganglijski brežuljak stvara stanice koje se u odrasloj dobi nalaze u pulvinaru (Rakic i Sidman, 1969, Letinic i Kostović, 1997). Ovdje treba spomenuti kako se na kalretininskim i kalbindinskim preparatima ne može isključiti da gangliotalamičko tijelo zapravo tvore neuroni koji iz dijela medijalnog telencefaličkoga zida koji se naslonio na talamus putuju u telencefalon. Neuroni u ovom području također ulaze u dorzalne dijelove talamusa.

Dobiveni podaci dosta snažno podupiru zaključak da se GAD67 reaktivne stanice koje dolaze iz hipotalamusa te dijelom iz retikularne jezgre talamusa usmjeravaju prema bazalnom telencefalonu gdje se nakupljaju zajedno s GAD67 reaktivnim neuronima koji dolaze iz GAD67/Mash1 reaktivnih područja medijalnog telencefaličkog zida i dijelova ganglijskog brežuljka. Zajednička molekularna svojstva (ekspresija GAD67) ovih stanica ukazuju na zajedničku razvojnu osnovu u ranim stadijima razvoja. Tako je krajem embrionalnog razdoblja uočen relativno masivan migratorni snop kojim se u bazo-kaudalnom dijelu iz spoja medijalnog ganglijskog brežuljka i diencefaona odvajaju neuroni koji ulaze u palijum. Tangencijalna migracija budućih GABA-ergičkih neurona iz diencefalona u palijum opisana je kod ptica i riba (Molnar i sur., 2006). Također, prvi neuroni koji ulaze u osnovu palijuma (engl. *predecessor cells*) dolaze iz područja mezo-diencefaličke granice (Bystron i sur., 2006), tako da nije neočekivano da kortikalni GABA-ergički neuroni potječu i iz diencefalona.

Iako je preoptičko područje, koje predstavlja prijelazno područje diencefalona i telencefalona, jasno opisano kao značajan izvor (najmanje 10% u miša) raznolikih subpopulacija GABA-ergičkih neurona palijuma (Gelman i sur., 2009, Gelman i sur., 2011), mogućnost da sam diencefalon značajnije sudjeluje u stvaranju telencefaličkih neurona, ne samo u najranijim razvojnim stadijima već i tijekom srednjeg fetalnog razdoblja, nije do sada razmatrano kao bitan razvojni fenomen. Ovakav zaključak je zapravo u skladu s rezultatima molekularno genetičkih istraživanja koja podupiru "neuromeričku" teoriju da rostralni sekundarni mjehurić prozencefalona obuhvaća cijeli prehordalni (najrostralniji) dio neuralne cijevi, što uključuje hipotalamus, preoptičko područje i možda čak ventro-rostalne dijelove talamusa (Puelles i Rubenstein, 1993, 2003, Vieira i sur., 2010, Moreno i Gonzalez, 2011, Puelles i sur., 2013).

#### **6.2.6 Proliferativne zone oko vrha temporalnog roga lateralnih moždanih klijetki kao važan izvor GABA-ergičkih neurona koji tijekom srednjeg fetalnog razdoblja migriraju u hipokampus i dalje prema marginalnoj zoni neopalijuma**

Krajem ranog fetalnog razdoblja, a pogotovo tijekom srednjeg fetalnog razdoblja, proliferativna zona u vrhu temporalnog režnja postaje izrazito masivna. Ova zona opisana je kao izvor neurona koji putuju u strukture temporalnog režnja, posebno subkortikalne u kojima dominiraju GABA-ergički neuroni - amigdala, jezgre bazalnog telencefalona i akumbens (Bernier i sur., 2002). Na temelju postojećih rezultata ne može se zaključiti predstavlja li ova zona palijalne proliferativne zone ili ekstenziju kaudalnog ganglijskog brežuljka (Ponti i sur., 2006). Široki dio proliferativne zone oko temporalnog ventrikula ne pokazuje GAD65 (niti GAD67) reaktivnost. No, u ranom fetalnom razdoblju niti stanice ventrikularne zone ganglijskog brežuljka ne izražavaju GAD65 reaktivnost, već je ona prisutna u dijelu subventrikularne zone.

Kako se GAD65 reaktivne stanice nalaze u subventrikularnoj zoni temporalnog režnja, odakle se masa GAD65 reaktivnih migratornih stanica dalje proteže u preostale dijelove temporalnog režnja, s priličnom sigurnošću se može tvrditi da se tijekom srednjeg fetalnog razdoblja ovdje stvara velik broj GABA-ergičkih neurona. Na ovim razinama u srednjem fetalnom razdoblju nije bilo moguće provesti Mash1 analizu, ali razvoj temporalnog režnja ukazuje kako se ovaj proliferativni dio možda razvija iz Mash1 proliferativnih zona paleokortikalnog ventrikula i kaudalnih dijelova medijalnog telencefaličkog zida, uz ekstenziju kaudalnog ganglijskog brežuljka. Obrazac GAD65 ekspresije kroz proliferativne zone temporalnog režnja ukazuje kako se veličina ove zone povećava na prijelazu ranog u srednje fetalno razdoblje. Ovakav nalaz u skladu je sa značajnim povećanjem udjela proliferativnih



stanica kaudalnog ganglijskog brežuljka kod majmuna i čovjeka u odnosu na miša i štakora (Hansen i sur., 2013, Ma i sur., 2013).

Oko ove zone nalaze se i brojne kalretininske stanice koje migriraju u amigdala i ostale subkortikalne strukture bazalnog telencefalona, kao i entorinalno područje. Zanimljivo je da se masa ovih stanica usmjerava i prema dorzalno i oblikuje periretikularnu jezgru, nakon čega se velik dio stanica uključuje u lateralni migratorni snop, što je u skladu s podacima kako je kaudalni ganglijski brežuljak glavni izvor kalretininske subpopulacije kortikalnih GABA-ergičkih neurona.

Ono što je posebno važno za temporalne proliferativne zone je da su one smještene blisko uz pijalnu površinu, posebno na medijalnom dijelu unkusa hipokampusa. Upravo se u unkusu vidi masa unipolarnih migratornih stanica koje izražavaju GAD65, ali i GAD67 kao i somatostatin. To govori u prilog da temporalne proliferativne zone nisu samo ekstenzija kaudalnog ganglijskog brežuljka u kojem se stvaraju primarno kalretininski neuroni, već i medijalnih Mash1 reaktivnih proliferativnih zona u kojima se stvaraju somatostatinski neuroni. Moguće je da su ovi somatostatinski neuroni primarno usmjereni u hipokampalnu formaciju u kojoj je veoma brojna subpopulacija ovih GABA-ergičkih neurona, posebno u stratum orijensu.

Kako se somatostatinske stanice gomilaju u ranom i srednjem fetalnom razdoblju kroz marginalnu zonu hipokampusa, a kasnije su posebno brojne u stratum orijensu, čini se da je marginalna zona hipokampusa glavni put kojim ovi neuroni migriraju od zona stvaranja i zatim ulaze u kortikalnu ili prolaze kroz hipokampalnu ploču. U tom smislu treba promatrati i povećanje gustoće i složenosti marginalne zone do kojeg dolazi krajem srednjeg fetalnog razdoblja. To ukazuje kako marginalna zona postaje sve važniji put tangencijalne migracije te je, uzimajući u obzir povećanje volumena (s obzirom na povećanje površine i širine marginalne zone), sredinom trudnoće marginalna zona najveći pravac tangencijalne migracije. Struktura i razvijenost proliferativnih zona snažno upućuju na to da su upravo proliferativne zone temporalnog režnja glavni izvor ovih neurona koji tangencijalno migriraju kroz marginalnu zonu.

## **6.3 VREMENSKI I PROSTORNI OBRAZAC STVARANJA I MIGRACIJE RAZLIČITIH POPULACIJA GABA-ergičkih NEURONA**

### **6.3.1 Porijeklo i odredište različitih populacija GABA-ergičkih neurona**

Tijekom fetalnog razvoja, na temelju ekspresije GAD izoforme razlikuju se dvije glavne populacije migratornih stanica. Vidljivo je kako GAD67 migratorne stanice potječu iz medijalnog zida i medijalnih dijelova ganglijskog brežuljka, kao i diencefalona te migriraju kroz marginalnu zonu i zonu ispod kortikalne ploče. Moguće je da GAD67 reaktivne stanice koje ulaze u palijum tijekom ranog fetalnog razvoja neće pripadati neuronima koji će se uključiti u kortikalnu ploču i kasnije biti u slojevima II-VI, već da će formirati neuralne krugove marginalne zone i budućeg sloja I ili neurone subplate sloja koji će u odrasloj dobi biti intersticijski neuroni bijele tvari. Vrlo rano tijekom fetalnog razdoblja vidljivi su diferencirani GAD67 neuroni u marginalnoj zoni i neposredno ispod kortikalne ploče. U trenutku stvaranja sekundarne kortikalne ploče, neuroni koje će postati dio subplate sloja, ova sekundarna kortikalna ploča i dosta širok dio ispod ploče sadrži relativno gusto poredane diferencirane GAD67 pozitivne neurone. Međutim, kako su telencefaličke GAD67 reaktivne proliferativne zone izvor somatostatinskih neurona vrlo je izgledno kako su ova područja najveći izvor somatostatinske populacije i GABA-ergičkih neurona korteksa. Ovdje treba naglasiti kako distribucija najranije diferenciranih GABA-ergičkih neurona palijuma (koji su GAD67 reaktivni) odgovara distribuciji diferenciranih somatostatinskih neurona, tako da su somatostatinski neuroni najranija diferencirana populacija GABA-ergičkih neurona.

U ovoj studiji pokazano je kako somatostatinski neuroni potječu iz proliferativne zone koja se nalazi između medijalnog i lateralnog ganglijskog brežuljka i odgovara dorzalnog dijelu medijalnog ganglijskog brežuljka koji je kod miša opisan kao izvor somatostatinskih neurona (Flames i sur., 2007, Fogarty i sur., 2007, Wonders i sur., 2008). Ovo područje doduše ima drukčiju strukturu proliferativnih zona od samog ganglijskog brežuljka, a možda je u kontinuitetu s proliferativnim područjem medijalnog zida rostro-ventralno od kalozalne ploče i dalje prema septalnom brežuljku.

Iako je u proliferativnom području medijalnog zida rostralno od kalozalne ploče prisutan značajan broj somatostatinskih stanica koje ulaze u marginalnu zonu, kod miša i majmuna je ovo područje opisano kao izvor neurona rostralnog migratornog snopa kojeg tvore kalretininski neuroni (Garcia-Moreno i sur., 2008). U čovjeka tijekom prvih godina postnatalnog razdoblja stanice iz rostralnog migratornog snopa više migriraju u marginalnu zonu orbitofrontalnog korteksa nego što ulaze u rostralni migratorni snop (Sanai i sur., 2011, Vilmit i Lelievre, 2012, Feliciano i Bordey, 2013). Slično je i s dorzalnim dijelom lateralnog ganglijskog brežuljka koji je kod miša dominantno izvor neurona za olfaktorni bulbus, dok kod



majmuna i čovjeka većina ovih neurona odlazi u koru velikoga mozga (Ma i sur., 2012, Ma i sur., 2013).

Tijekom ranog fetalnog razdoblja somatostatinske stanice se također značajno stvaraju u kaudalnom dijelu medijalnog telencefaličkoga zida, a kasnije tijekom srednjeg fetalnog razdoblja u proliferativnoj zoni sljepoočnog režnja. Kaudalni dijelovi medijalnog zida i temporalnog režnja najvjerojatniji su izvor somatostatinskih GABA-ergičkih neurona hipokampusu, gdje su isti posebno brojni u stratum oriensu. Somatostatinski neuroni hipokampusu specifični su i po činjenici da u hipokampusu, za razliku od neokortikalnih područja, postoji značajan broj neurona koji izražavaju somatostatin i parvalbumin (Jinno i Kosaka, 2000).

Put migracije somatostatinskih neurona tijekom ranog i srednjeg fetalnog razdoblja prolazi prvenstveno kroz marginalnu zonu i zonu ispod kortikalne ploče. Tijekom srednjeg fetalnog razdoblja dolazi do formiranja izrazito debelog sloja pod pločom pa nestaje jasan snop migracije neposredno ispod kortikalne ploče. Pretpostavka je da somatostatinske stanice nastavljaju migraciju prvenstveno kroz ovaj sloj, jer u marginalnoj zoni počinju prevladavati kalretininske stanice.

Somatostatinski neuroni trebali bi obuhvatiti i najveći dio populacije kalbindinskih neurona. Međutim, u analiziranom stadijima nije zamijećena ekspresija kalbindina u migratornim putevima GABA-ergičkih neurona, iako se ne očekuje da kalbindinski neuroni dolaze iz drugih izvora. Teško je moguće zaključiti o dodatnim izvorima kalbindinskih neurona i stoga što je kalbindin tijekom ranog i srednjeg fetalnog razvoja izražen u drugim populacijama neurona, kao što su Cajal-Retziusove stanice te neuroni limbičkog korteksa i subkortikalnih struktura.

Porijeklo parvalbuminskih neurona također nije moguće analizirati s obzirom na to da samo manji broj migratornih neurona izražava parvalbumin koji se najčešće pojavljuje u stanicama koje odmiču u diferencijaciji. Prve reaktivne parvalbuminske stanice zamjećene su u E56 oko paleokortikalnog ventrikula, što je u skladu s opisanim mjestom porijekla u miša, ventralni dio medijalnog ganglijskog brežuljka (Flames i sur., 2007, Fogarty i sur., 2007, Wonders i sur., 2008). Ovo također pokazuje i da se parvalbuminski neuroni počinju masovnije stvarati nešto kasnije, a ne na samom početku fetalnog razdoblja kao što je slučaj sa somatostatinskim i kalretininskim.

U miša je opisano kako većina kalretininskih kortikalnih GABA-ergičkih neurona potječe iz kaudalnog ganglijskog brežuljka. U ranom fetalnom razdoblju gustoća kalretininskih stanica u lateralnom migratornom snopu jednaka je gustoći GAD65 reaktivnih stanica. Kalretinin reaktivne stanice mogu se uočiti i u svim dijelovima ganglijskog brežuljka, što dosta jasno ukazuje da se kod majmuna kalretininski kortikalni neuroni stvaraju u svim dijelovima ganglijskog brežuljka, a ne samo u kaudalnom. Ovo opažanje nije u skladu s

postojećim eksperimentalnim podacima koji ukazuju kako većina kalretininskih GABA-ergičkih neurona potječe iz kaudalnog dijela ganglijskog brežuljka, odnosno dorzalnih proliferativnih zona kod primata. Činjenica je kako su istraživanja u majmuna i čovjeka relativno limitirana, a najznačajniji radovi (Hansen i sur., 2013, Ma i sur., 2013) svoja zapažanja prvenstveno temelje na ekspresiji transkripcijskih faktora i kolokalizaciji s biljezima kortikalnih GABA-ergičkih neurona.

Glavni pravac migracije kalretininskih neurona tijekom ranog fetalnog razdoblja je lateralni migratorni snop, odnosno granično područje subventrikularne/intermedijalne zone. Čini se da prema srednjem fetalnom razdoblju proliferativne zone oko temporalnog roga lateralne klijetke postaju važan izvor kalretininskih neurona. Oni jednim dijelom formiraju periretikularnu jezgru i usmjereni su prema dorzalno u lateralni migratorni snop, a drugim dijelom preko rostralnog dijela hipokampusa ulaze u marginalnu zonu i kroz nju u sve dijelove palijuma. Ovaj migratorni put je posebno zanimljiv jer se kroz nekoliko tjedana naglo povećava gustoća migratornih stanica koje su sredinom trudnoće najgušće te se čini kako ovdje dominiraju kalretininske stanice. S obzirom da u glodavaca nije opisano ovakvo događanje u marginalnoj zoni, moguće je da ono predstavlja važan novi migratorni put u primata. To je posebno važno, jer se gustoća i proporcija neurona u sloju I odrasla majmuna i čovjeka povećala nekoliko puta u odnosu na glodavce. Izrazito se povećala proporcija kalretininskih neurona pa tako kod majmuna i čovjeka ovi neuroni čine polovicu populacije u sloju I, a oko 20% u slojevima II i III (Džaja i sur., 2014, Džaja, 2015).

Kako bi došlo do tolikog povećanja proporcije, potrebne su nove proliferativne zone i putevi migracije. Uz već opisano, distribucija kalretinina i pojava GAD65 reaktivnosti u palijanim proliferativnim zonama tijekom srednjeg fetalnog razdoblja ukazuju na ove proliferativne zone kao novi važan izvor kalretininskih neurona.

Gore navedeno ukazuje da se obrazac stvaranja somatostatinskih i parvalbuminskih kortikalnih neurona nije kod primata značajnije promijenio, ali je došlo do stvaranja kalretininskih neurona u proliferativnim područjima gdje to nije slučaj u glodavaca. Također, dolazi i do značajne redistribucije neurona u migratornim putevima telencefalona. Ovi podaci su u skladu s promjenama proporcije unutar subpopulacija GABA-ergičkih neurona, gdje kod primata dolazi do peterostrukog povećanja udjela populacije kalretininskih neurona koji čine gotovo 50% od ukupnog broja kortikalnih GABA-ergičkih neurona.

### **6.3.2 Vrijeme stvaranja različitih populacija GABA-ergičkih neurona**

Posebno važan rezultat ove studije je podatak o značajnom stvaranju kalretininskih neurona tijekom ranog fetalnog razdoblja. Ne samo da se kalretininski neuroni stvaraju u područjima gdje to nije slučaj u glodavaca, već se započinju stvarati čim počne produkcija



GABA-ergičkih neurona. Ovo predstavlja značajno odstupanje u odnosu na glodavce, gdje se kalretininski neuroni stvaraju kasnije i tek pred kraj razdoblja neurogeneze dosežu vrhunac u intenzitetu proliferacije.

Čini se kako se somatostatinski neuroni ipak stvaraju nešto ranije nego kalretininski, možda čak i pred kraj embrionalnog razdoblja, s obzirom na to da su diferencirani oblici u marginalnoj zoni i ispod kortikalne ploče opisani već u stadiju E48. Ovaj podatak i nije iznenađenje s obzirom da se GAD67 pozitivne migratorne stanice stvaraju u evolucijski starijim dijelovima telencefalona koji ranije započinju s proliferacijom od novijih dijelova proliferativnih zona bazalnog telencefalona u kojima nema GAD67 reaktivnosti. Moguće je da ovi najranije stvoreni neuroni imaju i diencefaličko porijeklo.

Pitanje o kasnijem stvaranju parvalbuminskih neurona, ali i subpopulacije somatostatinskih koji izražavaju kalbindin ostaje otvoreno.

U srednjem fetalnom razdoblju teže je napraviti orijentaciju porijekla GABA-ergičkih neurona izvan septuma i ganglijskog brežuljka pa nije jasno nastavlja li se produkcija GABA-ergičkih neurona u medijalnom telencefaličkom zidu. U subkalozalnom dijelu i u dijelu ispod forniksa vidljivo je nakupljanje somatostatinskih i kalbindinskih stanica, a nakupine kalbindinskih i kalretininskih stanica vidljive su i retrosplenijalno. Ove stanice rade invaziju marginalne zone. Međutim, krajem srednjeg fetalnog razdoblja vidljivo je nakupljanje GAD67 pozitivnih stanica oko proliferativne zone u vrhu sljepoočnog režnja te intenzivne nakupine stanica periamigdaloidno i oko unkusa hipokampusa. Na ovim mjestima vidljive su i brojne nakupine somatostatinskih stanica. Ovo ukazuje na mogućnost da dolazi do daljnje ekspanzije proliferativnih stanica u kaudalnom dijelu telencefalona koje proizvode somatostatinske stanice koje zatim ulaze u marginalnu zonu sljepoočnog režnja.

Dobiveni podaci jasno ukazuju kako dvije glavne subpopulacije GABA-ergičkih neurona imaju različita mjesta porijekla, ali ne ukazuju na mjesto porijekla parvalbuminske subpopulacije. Također, ukazuju i kako se značajna produkcija GABA-ergičkih neurona nastavlja i u drugu polovicu trudnoće (Riccio i sur., 2012, Malik i sur., 2013, Hladnik i sur., 2014, Arshad i sur., 2016).

## **6.4 TANGENCIJALNA MIGRACIJA ne-GABA-ergičkih NEURONA**

Osim GABA-ergičkih neurona telencefalona, neradijalno migrira i nekoliko vrsta stanica kod kojih nije uočen GABA-ergički fenotip tijekom i neposredno po završetku migracije. Činjenica je kako ove stanice izražavaju biljege GABA-ergičkih neurona i nije jasno da li barem dio ovih stanica u kasnijim razdobljima počinje sintetizirati GABA-u. Tumačenje migracije populacija stanica proučavanih u ovoj studiji temelji se na ekspresiji kalretinina i kalbindina u zonama i slojevima gdje nije primjećena GAD reaktivnost te na Nissl i Golgi zapažanjima u ovim područjima.

### **6.4.1 Formiranje primordijalne kalretininske kortikalne ploče**

Prve stanice koje ulaze u palijum su gusto poredane horizontalne stanice za koje se smatra da dolaze iz područja mezencefalo-diencefaličke granice, područja olfaktornog ventrikula i bazalnog telencefalona te već u 4. tjednu nakon začeća (CS12) počinju ispunjavati primordijalnu marginalnu zonu, sloj iznad ventrikularne zone u kojem još nema proliferacije budućih neurona (Bystron i sur., 2006). Ove stanice nisu molekularno karakterizirane u toj studiji, no u studiji Meyer i sur. (2000) pokazano je da se u palijumu nešto prije 6. tjedna nakon začeća (CS16) subpijalno nalazi sloj reelin pozitivnih, horizontalno orijentiranih stanica, a tjedan dana kasnije reelin reaktivne stanice prisutne su kroz cjelokupnu primordijalnu marginalnu zonu i pridružuju im se kalretininske stanice iste morfologije. Nije isključeno da se ovdje dijelom radi o istim stanicama, ali je u 7. tjednu nakon začeća vidljivo da su reelin pozitivne stanice smještene subpijalno, a da kalretinin pozitivne stanice, uz prisustvo malog broja GAD reaktivnih stanica (za koje se također ne može isključiti da su kalretinin pozitivne), oblikuju primordijalnu kortikalnu ploču.

Ovdje treba jasno napomenuti da je pitanje razdvojenosti subpopulacija marginalne zone koje se mogu identificirati temeljem ekspresije kalbindina, kalretinina i reelina upitno. Naime, podaci ove studije dobiveni u majmuna pokazuju kako na samom početku fetalnog razdoblja (E46) velik broj subpijalno smještenih stanica (za koje se očekuje da su reelin reaktivne i označavaju rane Cajal-Retziusove stanice) izražava kalbindin, a kalretininske oblikuju primordijalnu kortikalnu ploču. Samo nekoliko dana kasnije, kalretinin reaktivne stanice koje morfološki odgovaraju Cajal-Retziusovima, gusto ispunjavaju marginalnu zonu. Tako se u srednjem fetalnom razdoblju čini da gotovo sve subpijalno smještene velike stanice, tzv. rane Cajal-Retziusove stanice, izražavaju i kalretinin i kalbindin.

No ipak, čini se da subpijalno smještene stanice u ovoj ranoj fazi predstavljaju odvojenu populaciju od kalretininskih koje oblikuju kortikalnu ploču. U dosadašnjim istraživanjima (Meyer i sur., 2000, Bystron i sur., 2006) predloženo je kako se najranije



stvorene stanice stvaraju izvan dorzalnog palijuma, ali da ubrzo počinje produkcija i u tim dijelovima. Tako je Meyer i sur. (2000) predložila kako se tijekom embrionalnog razdoblja izvan palijuma stvaraju samo reelinski neuroni koji se smještaju subpijalno, ali da se kasnije, tijekom 7. tjedna nakon začeća (CS19), i reelinski i kalretininski neuroni masivno stvaraju u palijumu. Bystron i sur. (2006) već tijekom 5. tjedna nakon začeća (CS14) pokazuju da se prve stanice koje se stvaraju u dorzalnog palijumu pridružuju stanicama koje dolaze iz drugih dijelova neuralne cijevi. No, niti promjene distribucije reelin pozitivnih stanica između CS17 i CS18 (6-6,5 PCW), a pogotovo promjene u distribuciji kalretinina (Meyer, 2007) ne govore u prilog masivnoj produkciji u lokalnim proliferativnim zonama.

Distribucija kalretininske reaktivnosti ukazuje kako kalretinin pozitivne stanice migriraju iz kaudo-ventralnih dijelova bazalnog telencefalona te zatim ulaze u kaudalne i lateralne dijelove palijuma. Upravo se od kaudalno prema lateralno i zatim rostralno počinje oblikovati kortikalna ploča, što jasno ukazuje da su prve stanice koje stvaraju kortikalnu ploču subpalijalnog porijekla te da izražavaju kalretinin. Meyer i sur. (Meyer i sur., 2000) su pokazali da se u 7. tjednu nakon začeća (CS20) unutar kalretininskih stanica kortikalne ploče nalaze i GAD reaktivne stanice, koje mogu biti i dio kalretininske populacije. Ovdje treba spomenuti da je u ovoj studiji pokazano kako su prvi diferencirani GAD neuroni prisutni već početkom fetalnog razdoblja i da izražavaju somatostatin, tako da je moguće da se radi o različitoj populaciji od kalretininskih koji oblikuju primordijalnu kortikalnu ploču.

U ovoj studiji analiziran je ljudski embrij starosti 6,5-7 tjedana nakon začeća (CS20, uz mogućnost da se radi o CS19 ili CS21). Na Nissl preparatima vidljiv je masivan migratorni snop koji dolazi iz kaudomedijalnih dijelova ganglijskog brežuljka i rostralnih dijelova diencefaličkih proliferativnih zona te se usmjerava prema lateralno. Kortikalna ploča, koja najvjerojatnije odgovara primordijalnoj kortikalnoj ploči u kojoj dominiraju kalretininske stanice i nema glutamatergičkih neurona, dobro je razvijena u ventro-lateralnim dijelovima i sastoji se od 3 reda stanica. U dijelovima gdje je prisutna primordijalna kortikalna ploča već je dobro razvijena i subventrikularna zona, što znači da će stanice ventrikularne zone započeti s asimetričnom diobom i stvaranjem prvih kortikalnih glutamatergičkih neurona koji će oblikovati pravu kortikalnu ploču. Ovo se događa tijekom 8. tjedna nakon začeća pa je u dobi od 8 tjedana kortikalna ploča prisutna u svim dijelovima neopalijuma što označava početak fetalnog razdoblja.

U ovoj studiji u početnom fetalnom razdoblju imunohistokemijski su analizirana i dva mozga majmuna. Distribucija kalretinina ukazuje kako upravo kalretininski neuroni oblikuju kortikalnu ploču i kako je njihovo porijeklo u ventrokaudalnom dijelu telencefalona. Ono što karakterizira rano fetalno razdoblje je izražajna kalretininska reaktivnost u stanicama diencefalna i telencefalona, već na samom početku (E46). U E46 je posebno gusto ispunjena cjelokupna marginalna zona medijalnog telencefaličkoga zida, što je zanimljivo stoga što kod

čovjeka u CS18 (odgovara E37 u majmuna) kalretininske stanice nalazimo ventralno od kaudalnog ganglijskog brežuljka i u sredini lateralnog zida, dok ih u medijalnim dijelovima nema. U roku od nekoliko dana (E48) gustoća kalretininskih stanica se posebno povećava u intermedijalnoj zoni palijuma i u ganglijskom brežuljku, a posebno je velika gustoća kalretininskih stanica u hipotalamusu, najventralnijim dijelovima talamusa i retikularnoj jezgri talamusa.

Laminarna distribucija kalretinina u palijumu u majmuna E46 u skladu je sa zaključkom Meyer i sur. (2000) kako se lokalno stvoreni, novo pridošli glutamatergički neuroni kortikalne ploče smještaju iznad postojećih kalretininskih neurona. Tako većina kalretininskih neurona primordijalne kortikalne ploče ostaje ispod kortikalne ploče, ali manji dio ipak ostaje iznad u marginalnoj zoni. Ono što se može zaključiti na temelju rezultata naše studije je kako se tijekom ranog fetalnog razdoblja povećava broj kalretininskih neurona ispod kortikalne ploče. Također se čini da se u najdorazalnijim dijelovima telencefalona tek počinje formirati kalretininska ploča.

Porijeklo neurona koji tvore primordijalnu kalretininsku ploču, kao i neurona koji se tijekom ranog fetalnog razdoblja priključuju kalretininskim neuronima ispod ploče, nije moguće jasno odrediti s obzirom na izrazito veliki stupanj kalretininske reaktivnosti tijekom ovog razdoblja. Nissl analiza ukazuje da tijekom embrionalnog razdoblja ovi neuroni nastaju u proliferativnim zonama rostralnog diencefalona i najranije formiranim dijelovima ganglijskog brežuljka. To uključuje preoptičko područje, proliferativne zone hipotalamusa i dijela ventralnog talamusa te medijalne dijelove medijalnog ganglijskog brežuljka. Upravo su to proliferativna područja koja pokazuju GAD67 reaktivnost i koja produciraju GABA-ergičke neurone za amigdala i bazalni telencefalon te neurone koji kroz marginalnu zonu i zonu ispod kortikalne ploče odlaze u neopalijum.

U ovom slučaju očekivalo bi se kako su kalretininski neuroni primordijane ploče GABA-ergički, no u ranom fetalnom stadiju distribucija GAD reaktivnih stanica ne ukazuje da je većina ovih neurona GABA-ergička. Moguće je da se GAD ekspresija javlja kasnije, a također nije isključeno da se radi o stanicama koje sintetiziraju drugi neurotransmiter. Također, u bazalnom telencefalonu je značajno veći broj kalretininskih naspram GABA-ergičkih stanica, no studije koje su izravno pokazale prisutnost nekog drugog neurotransmitera, posebice glutamata su rijetke (Gritti i sur., 2003). Stoga je moguće da ove stanice primordijalne ploče sintetiziraju neki od neurotransmitera prisutnih u bazalnom telencefalonu, kao dopamin ili acetilkolin s obzirom na to da su progenitorske stanice koje stvaraju i kolinergičke i GABA-ergičke neurone prisutne u proliferativnim zonama bazalnog telencefalona (Granger i sur., 2016).



#### 6.4.2 Porijeklo i migracija neurona marginalne zone

Marginalna zona u majmuna i čovjeka postaje daleko složenija nego kod glodavaca. Kao što je već navedeno, već po završetku 4. tjedna nakon začeća prve stanice ulaze u palijum. Radi se o stanicama koje imaju jedan nastavak, bez jasno izraženog aksona i dolaze iz područja subpalijuma. Najvjerojatnije se radi o reelin pozitivnim stanicama koje se danas definiraju kao Cajal-Retziusove stanice i smještaju se subpijalno.

U ovom su radu ove stanice klasificirane kao rane Cajal-Retziusove stanice, s obzirom na to da se klasični opisi Retziusa i Cajala odnose na opise tijekom druge polovice trudnoće (Meyer i sur., 1999). U najranijem stadiju u kojem je bilo raspoloživih imunohistokemijskih rezova (majmun E46), subpijalno smještene stanice tipične unipolarne morfologije izražavale su kalbindin. U palijumu, osim u marginalnoj zoni, nije bilo ekspresije kalbindina u stanicama ostalih slojeva, izuzev lokaliziranih mjesta proliferativnih zona u graničnom području prema koroidnom spletu, ali i u dijelovima koroidnog spleta. Struktura stanica u tom području jasno pokazuje da su ove granične proliferativne zone, ali i sam koroidni splet, izvor barem dijela ranih Cajal-Retziusovih stanica. U stadiju E46 kalretinin se ne zapaža u velikom broju subpijalno smještenih stanica, ali je zanimljivo da je intenzivna kalretininska reaktivnost samo nekoliko dana kasnije (majmun E48) primjetna gotovo u cijelom koroidnom spletu i susjednim zonama. Kasnije, tijekom srednjeg fetalnog razdoblja, subpijalno smještene stanice koje odgovaraju ranim Cajal-Retziusovima izražavaju i kalbindin i kalretinin, a dojam je da gustoća ranih Cajal-Retziusovih stanica odgovara gustoći velikih kalbindin i kalretinin reaktivnih horizontalnih subpijalno smještenih stanica. To bi značilo da sve rane Cajal-Retziusove stanice izražavaju kalbindin i kalretinin tijekom srednjeg fetalnog razdoblja, a ove stanice se mogu prepoznati i po ekspresiji acetilkolinesteraze.

Acetilkolinsko bojenje u fetusa čovjeka starog 11 tjedana pokazuju da ove stanice dolaze iz medijalnog telencefaličkog zida nešto kasnije, a ne na samom početku ranog fetalnog razdoblja. Na Nissl preparatima je dojam kako se u početnom dijelu ranog fetalnog razdoblja smanjuje gustoća ranih Cajal-Retziusovih stanica. Moguće je da prvi val migracije dolazi u embrionalnom razdoblju i čine ga stanice koje imaju diencefaličko porijeklo ili iz starijih subpalijalnih struktura. Već u ovom razdoblju mogu se sporadično zamijetiti stanice koje dolaze iz područja formiranja koroidnog spleta, na granici s osnovom hipokampusa. Očigledno je da smanjenjivanjem stvaranja i migracije iz diencefalona i starih dijelova subpalijuma, paralelno ne dolazi do povećanog stvaranja u medijalnom telencefalikom zidu, već se ovo zbiva s manjom odgodom.

Moguće je također da je rast palijuma u ovom razdoblju brži od povećanja brzine stvaranja Cajal-Retziusovih stanica pa one ne uspijevaju odgovarajućom brzinom ispuniti buduću osnovu kortikalne ploče. Naime, već u najranijem fetalnom razdoblju kalbindinska

reaktivnost prisutna je u amigdalama i subkortikalnim strukturama telencefalona, ali je također gusta na samoj površini bazalnog telencefalona. U ovaj dio ulazi migratorni snop koji dolazi iz pravca medijalnog ganglijskog brežuljka od dorzalno, a da istovremeno nema reaktivnosti u ganglijskom brežuljku niti u drugim zonama neopalijskuma, izuzev marginalne.

Kalbindin pozitivne stanice su u ranom fetalnom razdoblju poredane oko olfaktornog tuberkula što pokazuje da je i ovaj dio telencefalona izvor ranih Cajal-Retziusovih stanica. Ekstenzija lateralnog ventrikula, tzv. paleokortikalni ventrikul, prikazan je kod čovjeka u ranom fetalnom razdoblju kao izvor snopa reelin pozitivnih migratornih neurona koji ulaze u marginalnu zonu bazalnog telencefalona i dalje se raspršuju po palijumu (Meyer i Wahle, 1999). U ovoj je studiji na Golgi preparatima tijekom ranog fetanog razdoblja prisutan taj migratorni snop, ali se također vide i stanice u medijalnom zidu koji se odvajaju od spoja prema koroidnom spletu. Očigledno je kako su tijekom ranog fetalnog razdoblja paleokortikalni ventrikul, medijalni telencefalički zid u zoni spoja s koroidnim spletom, ali i sam koroidni splet izvor migratornog vala koji gusto popunjava marginalnu zonu sa Cajal-Retziusovim stanicama. Ovi podaci su u skladu s prijašnjim deskriptivnim studijama u fetusa čovjeka (Meyer, 2010), ali i eksperimentalnim studijama u miša (Bielle i sur., 2005) koji ukazuju na porijeklo Cajal-Retziusovih stanica iz različitih dijelova proliferativnih zona (Gil i sur., 2014).

Neurotransmitterska obilježja Cajal-Retziusovih stanica nisu do danas razriješena. S obzirom na to da u cjelokupnom analiziranom razdoblju nije zamijećena ekspresija GAD-a, kao i to da podaci iz literature pokazuju da ove stanice nemaju GABA-ergički fenotip, može se s priličnom sigurnošću tvrditi kako su ove stanice jasno odvojene od subpopulacija GABA-ergičkih neurona koji migriraju kroz ovu zonu.

Kasnije tijekom ranog i srednjeg fetalnog razdoblja vide se velike nakupine malih kalretinin i kalbindin pozitivnih stanica koje su smještene subkalozalno, u proliferativnoj zoni ispod forniksa, ispred kalozalne ploče, a posebno u retrosplenijalnom dijelu. Ove stanice usmjeravaju se kroz kalozalne septe, ali i kroz dio gdje nema spoja ventralnog i dorzalnog hipokampusa u marginalnu zonu. Zanimljivo je kako se ove stanice tijekom migracije preklapaju sa stanicama koje oblikuju girus dentatus, što može govoriti u prilog zajedničke proliferativne osnove, s obzirom na to da ove stanice također izražavaju ova dva kalcij vežuća proteina. Najvjerojatnije ove subkalozalne, subfornikalne i retrosplenijalne zone medijalnog telencefaličkog zida postaju glavni izvor Cajal-Retziusovih stanica koje tijekom ranog fetalnog razdoblja ulaze u marginalnu zonu. Upravo su tjedni prije sredine gestacije obilježeni povećanjem gustoće stanica u marginalnoj zoni pa tako i u subpijalnom dijelu gdje se povećava gustoća Cajal-Retziusovih stanica. S obzirom na to da je ovo razdoblje praćeno i povećanjem površine, jasno je kako se Cajal-Retziusove stanice najintenzivnije stvaraju upravo sredinom gestacije.



### **6.4.3 Formiranje hipokampalne ploče i tangencijalna migracija u području hipokampusa**

Hipokampus karakterizira kalbindinska reaktivnost u području u kojem nema pokazatelja prisustva GABA-ergičkih neurona. Kod majmuna su u samom hipokampusu kalbindinske stanice osim subprijalno vidljive i u E46 u donjem dijelu primordijalne marginalne zone. U ovom stadiju to predstavlja iznimku prema ostalim dijelovima korteksa gdje je kalbindinska reaktivnost vidljiva samo u subprijalno smještenim stanicama. Više kalbindinskih stanica nakuplja se u kaudalnim dijelovima. Kasnije tijekom ranog fetalnog razdoblja (E56) u većini hipokampalne formacije vidljivi su otočići kalbindin pozitivnih stanica.

Kalbindinska reaktivnost opisana je u pojedinim glutamatergičkim stanicama Amonovog roga te je moguće kako se upravo ovdje radi o najranijim stanicama hipokampalne ploče. Morfološki, ove kalbindin pozitivne stanice izgledaju kao budući piramidni neuroni hipokampusa. Osim kalbindinske reaktivnosti, izražena je kalretininska reaktivnost koja u kaudalnim dijelovima već u E48 oblikuje kalretininsku ploču debljine i do 5 redova stanica. Gustoća kalretininskih stanica u primordijalnoj hipokampalnoj ploči značajno je veća od gustoće kalbindinskih stanica. Nije jasno radi li se o stanicama koje izražavaju i kalbindin i kalretinin, no jasno je vidljivo da kalbindinske stanice koje ulaze u kortikalnu ploču dolaze iz istih kalbindin reaktivnih područja proliferativnih spojnih zona prema koroidnom spletu od kuda dolaze i horizontalne stanice koje migriraju kroz marginalnu zonu.

Ovi podaci ukazuju da se najranije stvoreni piramidni neuroni hipokampalne ploče ne stvaraju lokalno ispod svog konačnog odredišta već dolaze tangencijalnom migracijom iz specifičnih područja medijalnog telencefaličkoga zida.

## **6.5. ORGANIZACIJA RANE FETALNE NEURALNE MREŽE U KORTEKSU MAJMUNA I ČOVJEKA**

Već početkom ranog fetalnog razdoblja, i pored toga što su izraženiji procesi proliferacije i migracije, već se mogu uočiti neuroni u određenom stupnju diferencijacije. Funkcionalni krugovi koji su prisutni u ranom fetalnom razdoblju vezani su uz stanice koje imaju signalnu ulogu (Meyer i sur., 2002), ali postoje i prve sinapse koje uspostavljaju lokalni neuroni te koje su GABA-ergičke (Khazipov i sur., 2001).

### **6.5.1 Struktura i nastanak funkcionalnih krugova marginalne zone**

Marginalna zona sadržava najranije rođene stanice koje su ujedno najveće i najdiferenciranije stanice palijuma na početku ranog fetalnog razdoblja. Rane Cajal-Retziusove stanice nemaju jasno izražen akson te se njihova uloga veže uz proces signalizacije bitan za zaustavljanje radijalno migrirajućih stanica. Glavnu ulogu u signalizaciji ima reelin kojega sintetiziraju i izlučuju upravo Cajal-Retziusove stanice (Meyer i sur., 2002).

Osim Cajal-Retziusovih stanica, već na samom početku fetalnog razdoblja u marginalnoj zoni vidljive su GAD65/67 reaktivne stanice koje su prvenstveno smještene na granici marginalne zone i kortikalne ploče. Ove stanice u ranoj fazi izražavaju somatostatinsku reaktivnost i najvjerojatnije se radi o stanicama koje su tangencijalno migrirale iz područja bazalnog telencefalona. Zanimljivo je da se u ranom fetalnom razdoblju (majmun E56) u području entorinalnog korteksa u površnom dijelu kortikalne ploče vide otočići stanica u kojima se nalaze dobro diferencirani somatostatin/kalretinin reaktivni neuroni (Berger i Alvarez, 1996). Ovo su prvi diferencirani neuroni kortikalne ploče koji se, zanimljivo, nalaze u površnom dijelu.

U ovoj studiji je po prvi puta opisano kako se neposredno iznad kortikalne ploče nalaze najraniji dobro diferencirani neuroni koji očito pripadaju subpopulaciji somatostatinskih, iako se kasnije tijekom srednjeg fetanog razdoblja mogu u ovom podsloju sporadično uočiti i kalretinin i kalbindin pozitivne stanice. U tom razdoblju se ovaj sloj razlikuje od ostalih dijelova marginalne zone i površnih dijelova kortikalne ploče po NeuN reaktivnosti, što jasno ukazuje da se radi o dobro diferenciranim neuronima.

Funkcionalni značaj i projekcije ovih ranih GABA-ergičkih neurona nisu poznate. Moguće je da se radi i o projekcijskim GABA-ergičkim neuronima (Clancy i sur., 2010) za koje se smatra da pripadaju najranije stvorenim GABA-ergičkim neuronima. Također, prvi funkcionalni krugovi hipokampusa vezani su uz GABA-ergičku signalizaciju (Khazipov i sur., 2001) kao i u osnovi neokorteksa. Ovi neuroni mogu predstavljati prve stanične elemente koji uspostavljaju prve funkcionalne GABA-ergičke sinapse. Ove sinapse najvjerojatnije se



uspostavljaju s nastavcima piramidnih neurona koji se razgranjuju u marginalnoj zoni, jer u ranom fetalnom razdoblju nema sinaptičkih kontakata unutar kortikalne ploče (Kostović i Molliver, 1974, Kostović i Rakic, 1990). Moguće je i da ove somatostatinske stanice nesinaptički izlučuju GABA-u unutar kortikalne ploče koja ima trofički utjecaj na razvoj piramidnih neurona.

Ovdje treba spomenuti da, iako se diferencirani neuroni nalaze na samom početku fetalnog razvoja u marginalnoj zoni, njihova se gustoća povećava sve do sredine trudnoće. Tako se, osim na samoj granici s kortikalnom pločom, diferencirani somatostatinski neuroni mogu sporadično uočiti subpikalno gdje se morfološki jasno razlikuju od horizontalno orijentiranih Cajal-Retziusovih stanica. Stoga u majmuna i čovjeka marginalna zona ne postaje do sredine trudnoće samo sve važniji migratorni put za različite populacije GABA-ergičkih neurona, već i sve složenija struktura koju sačinjavaju raznovrsni diferencirani neuroni. Kako se proporcija kortikalnih neurona koju nalazimo u sloju I povećava 3 do 5 puta u primata u usporedbi s glodavcima, vrlo je vjerojatno kako ovi neuroni većinom nisu samo dio prolazne fetalne, već čine dio odrasle neuralne mreže kore velikoga mozga.

#### **6.5.2 Pojava diferenciranih neurona u intermedijalnoj zoni i primordijalni sloj pod pločom kao koridor migracije**

Kostović i Molliver (Kostović i Molliver, 1974) postavili su koncept postojanja prolaznih fetalnih neuralnih krugova koje stvaraju neuroni neposredno iznad i ispod kortikalne ploče. Posebno je zanimljivo bilo formiranje sloja pod pločom, koje u čovjeka započinje odvajanjem neurona donjeg dijela kortikalne ploče u razdoblju između 11. do 13. tjedna nakon začeća. Ovaj sloj postaje sredinom trudnoće najdeblji sloj telencefalona i sadrži brojne dobro diferencirane neurone s najvažnijom ulogom uspostave sinapsi s urastajućim talamokortikalnim aksonima koji u ovom sloju „čekaju“ prije urastanja u kortikalnu ploču (Kostović i Rakic, 1990).

Iako je ovaj koncept postao opće prihvaćen i subplate zona definirana kao jedna od osnovnih telencefaličkih slojeva (Bystron i sur., 2008), još uvijek postoji kontroverza među dijelom razvojnih neurobiologa (Marin-Padilla, 1978, Luskin i Shatz, 1985, Valverde i sur., 1989, Allendoerfer i Shatz, 1994). Naime, prema podacima na glodavcima većina neurona subplate sloja potječe od stanica koje su se nalazile u osnovi telencefalona prije formiranja same kortikalne ploče, a tek vrlo malim dijelom od neurona koji su bili u sastavu kortikalne ploče.

Podaci u ovoj studiji, koji se temelje na ekspresiji GAD67, jasno su ukazali kako se u majmuna diferencirane GABA-ergičke stanice koje ispunjavaju donji dio kortikalne ploče tijekom ranog fetalnog razdoblja, tijekom srednjeg fetalnog razdoblja nalaze u zoni ispod

kortikalne ploče. To ukazuje kako sloj ispod ploče većinom nastaje sekundarno od neurona kortikalne ploče, a ne od stanica prisutnih prije nastanka kortikalne ploče.

Doduše, rezultati ovog istraživanja su ukazali da najranije rođene stanice koje tvore primordijalnu ploču i izražavaju kalretinin većinom ostaju ispod kortikalne ploče. Rezultati su pokazali da već i u ranom fetalnom stadiju u ovaj sloj ispod kortikalne ploče ulaze dodatne tangencijalno migrirajuće stanice. U najranije analiziranom stadiju s raspoloživim imunohistokemijskim rezovima (E46) vidljive su dobro diferencirane somatostatinske i GAD67 reaktivne stanice smještene neposredno ispod kortikalne ploče. Kako su na vrhu kortikalne ploče smještene stanice istih molekularnih svojstava kao i ove moguće je da su sve bile dio primordijalne kortikalne ploče u kojoj su opisane GAD reaktivne stanice (Meyer i sur., 2000).

Zanimljivo je da se prije početka formiranja sekundarne kortikalne ploče ne može na temelju imunohistokemijskog, Nissl i Golgi bojenja jasno identificirati sloj diferenciranih stanica ispod kortikalne ploče. Diferencirane stanice su relativno ravnomjerno raspršene kroz cijelu širinu intermedijalne zone, ali se sloj ispod kortikalne ploče raspoznaje kao zona gusto poredanih tangencijalno migrirajućih GAD67 reaktivnih stanica.

Ovo zapažanje dovodi u pitanje funkcionalnu povezanost i kontinuitet najranije diferenciranih stanica izvan kortikalne ploče i stanica koje se odvajaju iz kortikalne ploče. Rezultati ovog istraživanja također ukazuju na važnost dodatnih, tangencijalno migrirajućih stanica koje kroz cijelo rano i srednje fetalno razdoblje ulaze u sastav subplate sloja.



## 7. ZAKLJUČCI:

- 1) Tijekom ranog fetalnog razdoblja izvor tangencijalno migrirajućih stanica telencefalona su proliferativne zone medijalnog telencefaličkog zida te proliferativne zone ganglijskog brežuljka i preoptičkog područja, ali i proliferativne zone hipotalamusa i ventralnog talamusa.
- 2) Proliferativne zone oko vrha temporalnog roga lateralnih klijetki postaju važan izvor tangencijalno migrirajućih stanica subkortikalnih i kortikalnih limbičkih struktura, ali i migratornih stanica marginalne zone tijekom srednjeg fetalnog razdoblja.
- 3) U srednjem fetalnom razdoblju počinje značajna produkcija GABA-ergičkih neurona i u palijalnim (dorzalnim) proliferativnim zonama te su i ove zone važan izvor neradijalno migrirajućih stanica.
- 4) U ranom fetalnom razdoblju tri su glavna puta tangencijalne migracije: kroz gornji dio subventrikularne zone, neposredno ispod kortikalne ploče te kroz marginalnu zonu.
- 5) Na ovim putevima stanice se razlikuju po stupnju ekspresije jedne od dvije GAD izoforme, GAD65 i GAD67.
- 6) Migratorne stanice koje izražavaju GAD67 dolaze iz specifičnih, do sada neopisanih dijelova rostro-dorzalnog i ventro-kaudalnog dijela medijalnog telencefaličkog zida te ventralnih dijelova lateralnog zida izvan ganglijskog brežuljka.
- 7) U ovim novim proliferativnim telencefaličkim zonama stvara se somatostatinska populacija GABA-ergičkih neurona koji migriraju kroz marginalnu zonu i zonu ispod kortikalne ploče.
- 8) U ranom fetalnom razdoblju među GABA-ergičkim stanicama koje napuštaju ganglijski brežuljak i ulaze u subventrikularnu zonu dominiraju kalretininske stanice, koje su već u najranijem fetalnom razdoblju jednako gusto distribuirane kao i GAD65 reaktivne stanice.
- 9) Na prijelazu embrionalnog u fetalno razdoblje tangencijalnom migracijom iz prednjeg dijela diencefalona i ventro-medijalnog dijela ganglijskog brežuljka dolaze ne-GABA-ergičke stanice koje izražavaju kalretinin i u palijumu formiraju primordijalnu kortikalnu ploču.

10) Cajal-Retziusove stanice izražavaju kalbindin i kalretinin te tangencijalno migriraju iz koroidnog spleta, spojnih zona prema koroidnom spletu i iz paleokortikalnog ventrikula, a kasnije iz područja forniksa i retrosplenijalnog područja. Intenzivno se stvaraju tijekom ranog i srednjeg fetalnog razdoblja, a njihovo se stvaranje posebno intenzivira oko sredine trudnoće.

11) Ne-GABA-ergičke kalbindin reaktivne rane piramidne stanice hipokampusa također tangencijalno migriraju iz medijalnog telencefaličkog zida.

12) Marginalna zona postaje sve važniji i masivniji put migracije tijekom srednjeg fetalnog razdoblja te ima složenu laminarnu organizaciju, s više gustih migratornih podslojeva, ali i više podslojeva s diferenciranim neuronima.



## 8. SAŽETAK

U istraživanju su mikroskopski analizirani rezovi postmortalnog ljudskog i majmuskog fetalnog tkiva mozga obrađeni imunohistokemijskim i klasičnim neurohistološkim metodama. Uspoređujući promjene molekularnih obilježja i distribuciju tangencijalno migrirajućih stanica telencefalona u majmuna i čovjeka tijekom prve polovice trudnoće, predložena su mjesta njihova porijekla i putevi migracije.

Na osnovi GAD65 ekspresije potvrđeno je da ganglijski brežuljak predstavlja najvažniji izvor GABA-ergičkih neurona koji migriraju u palijum te da se tijekom srednjeg fetalnog razdoblja značajna produkcija GABA-ergičkih neurona započinje odvijati i u palijalnim proliferativnim zonama. Uz ova mjesta stvaranja GABA-ergičkih neurona, GAD67 reaktivne migratorne stanice opisane su kako ulaze u palijum kroz bazalni telencefalon. U ranom fetalnom razdoblju ovi budući GABA-ergički neuroni stvaraju se u preoptičkom području i proliferativnim zonama hipotalamusa, i u do sada neopisanim proliferativnim zonama rostralnog i ventro-kaudalnog dijela medijalnog telencefaličkog zida. Tijekom srednjeg fetalnog razdoblja posebno se povećavaju proliferativne zone oko vrha temporalnog roga lateralnih klijetki u kojima se stvaraju GABA-ergički neuroni za limbičke strukture i GABA-ergički neuroni koji migriraju kroz marginalnu zonu.

Rezultati su također pokazali da tijekom ranog fetalnog razdoblja dvije glavne subpopulacije GABA-ergičkih kortikalnih neurona, somatostatinska i kalretininska, imaju različito porijeklo i puteve migracije. U putevima migracije gdje dominira GAD67 reaktivnost, kroz marginalnu zonu i zonu neposredno ispod kortikalne ploče, posebno su brojne stanice koje izražavaju somatostatin. U lateralnom migratornom snopu kroz subventrikularnu zonu dominiraju kalretinin pozitivne stanice koje su već u najranijem fetalnom razdoblju jednako gusto distribuirane kao i GAD65 reaktivne stanice. Ovi podaci po prvi puta pokazuju kako se kod primata kalretininski neuroni masovno stvaraju vrlo rano, a ne kasnije tijekom neurogeneze kao u glodavaca.

Tangencijalno migriraju i populacije ne-GABA-ergičkih neurona. Na prijelazu embrionalnog u fetalno razdoblje tangencijalnom migracijom iz prednjeg dijela diencefalona i ventro-medijalnog dijela ganglijskog brežuljka dolaze stanice koje izražavaju kalretinin i u palijumu formiraju primordijalnu kortikalnu ploču. Na samom početku fetalnog razdoblja kroz marginalnu zonu tangencijalno migriraju kalbindin pozitivne rane Cajal-Retziusove stanice koje dolaze iz koroidnog spleta i spojnih zona prema palijumu. Tijekom srednjeg fetalnog razdoblja u ovim zonama se i dalje intenzivno stvaraju kalbindin/kalretinin reaktivne Cajal-Retziusove stanice koje migriraju u marginalnu zonu, posebno intenzivno u području forniksa i retrosplenijalnom području. Osim ovih ne-GABA-ergičkih stanica, tangencijalno migriraju i rane kalbindin reaktivne piramidne stanice hipokampusa.

## 9. SUMMARY

### **Tangential migration of cells in human and monkey telencephalon during early fetal period, Ana Hladnik, 2016.**

In this study postmortem human and monkey fetal brain tissue processed by classical neurohistological and immunohistochemical methods was analyzed. Comparing changes in molecular characteristics and distribution of tangentially migrating cells in the human and monkey telencephalon during the first half of gestation, places of their origin and tangential migration pathways were proposed.

Data confirmed that the ganglionic eminence is the most important source of GABA-ergic neurons that migrate tangentially to the pallium, and that significant production of GABA-ergic neurons occurs in the dorsal proliferative zones during the middle fetal period. These cells predominantly express GAD65, but there is also a migratory population that predominantly expresses GAD67 and enters the pallium through the basal telencephalon. During the early fetal period, these cells originate from preoptic area and hypothalamic proliferative zones, and from so far undescribed proliferative zones of rostro-dorsal and ventro-caudal part of the medial telencephalic wall. During the middle fetal period, the proliferative zone around the temporal horn of lateral ventricle enlarges, and gives GABA-ergic neurons for limbic structures and GABA-ergic neurons that migrate through the marginal zone.

Data also suggested that during early fetal period, two major subpopulations of cortical GABA-ergic neurons have different place of origin and different migratory routes. GAD67 positive cells migrate through the marginal zone and the layer under the cortical plate and express somatostatin, while GAD65 positive cells migrate inside lateral migratory stream through the subventricular zone and express calretinin. This suggests that in primate significant production of calretinin neurons occurs earlier than in rodents.

Populations of non-GABA-ergic cells also migrate tangentially. Calretinin positive cells from anterior part of diencephalon and ventro-medial part of ganglionic eminence migrate tangentially to the pallium and form primordial cortical plate at the end of embryonic and beginning of early fetal period. During early fetal period, calbindin positive Cajal-Retzius like cells originate from the choroid plexus and coupling proliferative zone and migrate tangentially through marginal zone, especially intensive in the fornix and retrosplenium during the middle fetal period. In addition, calbindin expressing pyramidal cells that form the precursor of hippocampal plate also migrate tangentially.



## 10. POPIS LITERATURE

- Aboitiz F, Montiel J (2007) Origin and evolution of the vertebrate telencephalon, with special reference to the mammalian neocortex. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 193:1-112.
- Abraham H, Perez-Garcia CG, Meyer G (2004) p73 and Reelin in Cajal-Retzius cells of the developing human hippocampal formation. *Cereb Cortex* 14:484-495.
- Al-Jaberi N, Lindsay S, Sarma S, Bayatti N, Clowry GJ (2013) The Early Fetal Development of Human Neocortical GABAergic Interneurons. *Cereb Cortex*.
- Allendoerfer KL, Shatz CJ (1994) The subplate, a transient neocortical structure: its role in the development of connections between thalamus and cortex. *Annu Rev Neurosci* 17:185-218.
- Anderson SA, Eisenstat DD, Shi L, Rubenstein JL (1997) Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on Dlx genes. *Science* 278:474-476.
- Anderson SA, Kaznowski CE, Horn C, Rubenstein JL, McConnell SK (2002) Distinct origins of neocortical projection neurons and interneurons in vivo. *Cereb Cortex* 12:702-709.
- Angevine JB, Sidman RL (1961) Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature* 192:766-768.
- Antanitus DS, Choi BH, Lapham LW (1976) The demonstration of glial fibrillary acidic protein in the cerebrum of the human fetus by indirect immunofluorescence. *Brain Res* 103:613-616.
- Antypa M, Faux C, Eichele G, Parnavelas JG, Andrews WD (2011) Differential gene expression in migratory streams of cortical interneurons. *Eur J Neurosci* 34:1584-1594.
- Arshad A, Vose LR, Vinukonda G, Hu F, Yoshikawa K, Csiszar A, Brumberg JC, Ballabh P (2016) Extended Production of Cortical Interneurons into the Third Trimester of Human Gestation. *Cerebral Cortex* 26:2242-2256.
- Ascoli GA, Alonso-Nanclares L, Anderson SA, Barrionuevo G, Benavides-Piccione R, Burkhalter A, Buzsaki G, Cauli B, Defelipe J, Fairen A, Feldmeyer D, Fishell G, Fregnac Y, Freund TF, Gardner D, Gardner EP, Goldberg JH, Helmstaedter M, Hestrin S, Karube F, Kisvarday ZF, Lambolez B, Lewis DA, Marin O, Markram H, Munoz A, Packer A, Petersen CC, Rockland KS, Rossier J, Rudy B, Somogyi P, Staiger JF, Tamas G, Thomson AM, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, West DC, Yuste R (2008) Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 9:557-568.
- Bakst I, Morrison JH, Amaral DG (1985) The distribution of somatostatin-like immunoreactivity in the monkey hippocampal formation. *J Comp Neurol* 236:423-442.
- Barinka F, Druga R (2010) Calretinin expression in the mammalian neocortex: a review. *Physiol Res* 59:665-677.
- Barinka F, Salaj M, Rybar J, Krajcovicova E, Kubova H, Druga R (2012) Calretinin, parvalbumin and calbindin immunoreactive interneurons in perirhinal cortex and temporal area Te3V of the rat brain: qualitative and quantitative analyses. *Brain Res* 1436:68-80.
- Batista-Brito R, Rossignol E, Hjerling-Leffler J, Denaxa M, Wegner M, Lefebvre V, Pachnis V, Fishell G (2009) The cell-intrinsic requirement of Sox6 for cortical interneuron development. *Neuron* 63:466-481.
- Beaulieu C (1993) Numerical data on neocortical neurons in adult rat, with special reference to the GABA population. *Brain Res* 609:284-292.
- Berger B, Alvarez C (1996) Neurochemical development of the hippocampal region in the fetal rhesus monkey, III: calbindin-D28K, calretinin and parvalbumin with special mention of cajal-retzius cells and the retrosplenial cortex. *J Comp Neurol* 366:674-699.

- Berger B, Alvarez C, Goldman-Rakic PS (1993) Neurochemical development of the hippocampal region in the fetal rhesus monkey. I. Early appearance of peptides, calcium-binding proteins, DARPP-32, and monoamine innervation in the entorhinal cortex during the first half of gestation (E47 to E90). *Hippocampus* 3:279-305.
- Berger B, De Grissac N, Alvarez C (1999) Precocious development of parvalbumin-like immunoreactive interneurons in the hippocampal formation and entorhinal cortex of the fetal cynomolgus monkey. *J Comp Neurol* 403:309-331.
- Berger B, Esclapez M, Alvarez C, Meyer G, Catala M (2001) Human and monkey fetal brain development of the supramammillary-hippocampal projections: a system involved in the regulation of theta activity. *J Comp Neurol* 429:515-529.
- Bernier PJ, Bedard A, Vinet J, Levesque M, Parent A (2002) Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11464-11469.
- Bielle F, Griveau A, Narboux-Neme N, Vigneau S, Sigrist M, Arber S, Wassef M, Pierani A (2005) Multiple origins of Cajal-Retzius cells at the borders of the developing pallium. *Nat Neurosci* 8:1002-1012.
- Blum BP, Mann JJ (2002) The GABAergic system in schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol* 5:159-179.
- Braak H, Braak E (1985) Golgi preparations as a tool in neuropathology with particular reference to investigations of the human telencephalic cortex. *Prog Neurobiol* 25:93-139.
- Brodmann K (1908) Beitrage zur histologischen lokalisation der grosshirnrinde. VI. Mitteilung: die cortexgliederung des menschen. *J Psychol Neurol (Lzp)* 10:231-246.
- Burkhalter A (2008) Many specialists for suppressing cortical excitation. *Front Neurosci* 2:155-167.
- Butt SJ, Cobos I, Golden J, Kessar N, Pachnis V, Anderson S (2007) Transcriptional regulation of cortical interneuron development. *J Neurosci* 27:11847-11850.
- Butt SJ, Fuccillo M, Nery S, Noctor S, Kriegstein A, Corbin JG, Fishell G (2005) The temporal and spatial origins of cortical interneurons predict their physiological subtype. *Neuron* 48:591-604.
- Butt SJ, Sousa VH, Fuccillo MV, Hjerling-Leffler J, Miyoshi G, Kimura S, Fishell G (2008) The requirement of Nkx2-1 in the temporal specification of cortical interneuron subtypes. *Neuron* 59:722-732.
- Bystron I, Blakemore C, Rakic P (2008) Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nat Rev Neurosci* 9:110-122.
- Bystron I, Rakic P, Molnar Z, Blakemore C (2006) The first neurons of the human cerebral cortex. *Nat Neurosci* 9:880-886.
- Cabrera-Socorro A, Hernandez-Acosta NC, Gonzalez-Gomez M, Meyer G (2007) Comparative aspects of p73 and Reelin expression in Cajal-Retzius cells and the cortical hem in lizard, mouse and human. *Brain Res* 1132:59-70.
- Cameron RS, Rakic P (1991) Glial cell lineage in the cerebral cortex: a review and synthesis. *Glia* 4:124-137.
- Cao QL, Yan XX, Luo XG, Garey LJ (1996) Prenatal development of parvalbumin immunoreactivity in the human striate cortex. *Cereb Cortex* 6:620-630.
- Caputi A, Rozov A, Blatow M, Monyer H (2009) Two calretinin-positive GABAergic cell types in layer 2/3 of the mouse neocortex provide different forms of inhibition. *Cereb Cortex* 19:1345-1359.
- Casarosa S, Fode C, Guillemot F (1999) Mash1 regulates neurogenesis in the ventral telencephalon. *Development* 126:525-534.
- Caviness VS, Goto T, Tarui T, Takahashi T, Bhide PG, Nowakowski RS (2003) Cell Output, Cell Cycle Duration and Neuronal Specification: a Model of Integrated Mechanisms of the Neocortical Proliferative Process. *Cerebral Cortex* 13:592-598.



- Caviness VS, Jr., Rakic P (1978) Mechanisms of cortical development: a view from mutations in mice. *Annu Rev Neurosci* 1:297-326.
- Choi BH (1986) Glial fibrillary acidic protein in radial glia of early human fetal cerebrum: a light and electron microscopic immunoperoxidase study. *J Neuropathol Exp Neurol* 45:408-418.
- Choi BH, Lapham LW (1978) Radial glia in the human fetal cerebrum: a combined Golgi, immunofluorescent and electron microscopic study. *Brain Res* 148:295-311.
- Clancy B, Defelipe J, Espinosa A, Fairen A, Jinno S, Kanold P, Luhmann HJ, Rockland KS, Tamamaki N, Yan XX (2010) Cortical GABAergic Neurons: Stretching it Remarks, Main Conclusions and Discussion. *Front Neuroanat* 4:7.
- Conde F, Lund JS, Jacobowitz DM, Baimbridge KG, Lewis DA (1994) Local circuit neurons immunoreactive for calretinin, calbindin D-28k or parvalbumin in monkey prefrontal cortex: distribution and morphology. *J Comp Neurol* 341:95-116.
- Corbin JG, Butt SJ (2011) Developmental mechanisms for the generation of telencephalic interneurons. *Dev Neurobiol* 71:710-732.
- Corbin JG, Gaiano N, Juliano SL, Poluch S, Stancik E, Haydar TF (2008) Regulation of neural progenitor cell development in the nervous system. *J Neurochem* 106:2272-2287.
- deAzevedo LC, Fallet C, Moura-Neto V, Daumas-Duport C, Hedin-Pereira C, Lent R (2003) Cortical radial glial cells in human fetuses: depth-correlated transformation into astrocytes. *J Neurobiol* 55:288-298.
- DeDiego I, Smith-Fernandez A, Fairen A (1994) Cortical cells that migrate beyond area boundaries: characterization of an early neuronal population in the lower intermediate zone of prenatal rats. *Eur J Neurosci* 6:983-997.
- Defelipe J (2011) The evolution of the brain, the human nature of cortical circuits, and intellectual creativity. *Front Neuroanat* 5:29.
- DeFelipe J, Elston GN, Fujita I, Fuster J, Harrison KH, Hof PR, Kawaguchi Y, Martin KA, Rockland KS, Thomson AM, Wang SS, White EL, Yuste R (2002) Neocortical circuits: evolutionary aspects and specificity versus non-specificity of synaptic connections. Remarks, main conclusions and general comments and discussion. *J Neurocytol* 31:387-416.
- DeFelipe J, Farinas I (1992) The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog Neurobiol* 39:563-607.
- DeFelipe J, Jones EG (1988) *Cajal on the Cerebral Cortex, An Annotated Translation of the Complete Writings*. New York, Oxford: Oxford University Press.
- DeFelipe J, Lopez-Cruz PL, Benavides-Piccione R, Bielza C, Larranaga P, Anderson S, Burkhalter A, Cauli B, Fairen A, Feldmeyer D, Fishell G, Fitzpatrick D, Freund TF, Gonzalez-Burgos G, Hestrin S, Hill S, Hof PR, Huang J, Jones EG, Kawaguchi Y, Kisvarday Z, Kubota Y, Lewis DA, Marin O, Markram H, McBain CJ, Meyer HS, Monyer H, Nelson SB, Rockland K, Rossier J, Rubenstein JL, Rudy B, Scanziani M, Shepherd GM, Sherwood CC, Staiger JF, Tamas G, Thomson A, Wang Y, Yuste R, Ascoli GA (2013) New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. *Nat Rev Neurosci* 14:202-216.
- Dehay C, Kennedy H (2007) Cell-cycle control and cortical development. *Nat Rev Neurosci* 8:438-450.
- del Rio MR, DeFelipe J (1996) Colocalization of calbindin D-28k, calretinin, and GABA immunoreactivities in neurons of the human temporal cortex. *J Comp Neurol* 369:472-482.
- del Rio MR, DeFelipe J (1997) Colocalization of parvalbumin and calbindin D-28k in neurons including chandelier cells of the human temporal neocortex. *J Chem Neuroanat* 12:165-173.

- Ding SL, Rockland KS, Zheng DS (2000) Parvalbumin immunoreactive Cajal-Retzius and non-Cajal-Retzius neurons in layer I of different cortical regions of human newborn. *Anat Embryol (Berl)* 201:407-417.
- Dinocourt C, Petanjek Z, Freund TF, Ben-Ari Y, Esclapez M (2003) Loss of interneurons innervating pyramidal cell dendrites and axon initial segments in the CA1 region of the hippocampus following pilocarpine-induced seizures. *J Comp Neurol* 459:407-425.
- Džaja D (2015) Morfološka i kemijska obilježja kalretininskih neurona u neokorteksu primata Zagreb: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- Džaja D, Hladnik A, Bicanic I, Bakovic M, Petanjek Z (2014) Neocortical calretinin neurons in primates: increase in proportion and microcircuitry structure. *Front Neuroanat* 8:103.
- Eisenstat DD, Liu JK, Mione M, Zhong W, Yu G, Anderson SA, Ghattas I, Puelles L, Rubenstein JL (1999) DLX-1, DLX-2, and DLX-5 expression define distinct stages of basal forebrain differentiation. *J Comp Neurol* 414:217-237.
- Esclapez M, Tillakaratne NJ, Kaufman DL, Tobin AJ, Houser CR (1994) Comparative localization of two forms of glutamic acid decarboxylase and their mRNAs in rat brain supports the concept of functional differences between the forms. *J Neurosci* 14:1834-1855.
- Faux C, Rakic S, Andrews W, Yanagawa Y, Obata K, Parnavelas JG (2010) Differential gene expression in migrating cortical interneurons during mouse forebrain development. *J Comp Neurol* 518:1232-1248.
- Feliciano DM, Bordey A (2013) Newborn cortical neurons: only for neonates? *Trends Neurosci* 36:51-61.
- Fertuzinhos S, Krsnik Z, Kawasaki YI, Rasin MR, Kwan KY, Chen JG, Judaš M, Hayashi M, Sestan N (2009) Selective depletion of molecularly defined cortical interneurons in human holoprosencephaly with severe striatal hypoplasia. *Cereb Cortex* 19:2196-2207.
- Flames N, Pla R, Gelman DM, Rubenstein JL, Puelles L, Marin O (2007) Delineation of multiple subpallial progenitor domains by the combinatorial expression of transcriptional codes. *J Neurosci* 27:9682-9695.
- Fogarty M, Grist M, Gelman D, Marin O, Pachnis V, Kessaris N (2007) Spatial genetic patterning of the embryonic neuroepithelium generates GABAergic interneuron diversity in the adult cortex. *J Neurosci* 27:10935-10946.
- Forbes CE, Grafman J (2010) The role of the human prefrontal cortex in social cognition and moral judgment. *Annu Rev Neurosci* 33:299-324.
- Freund TF, Buzsaki G (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6:347-470.
- Gabbott PL, Bacon SJ (1996a) Local circuit neurons in the medial prefrontal cortex (areas 24a,b,c, 25 and 32) in the monkey: I. Cell morphology and morphometrics. *J Comp Neurol* 364:567-608.
- Gabbott PL, Bacon SJ (1996b) Local circuit neurons in the medial prefrontal cortex (areas 24a,b,c, 25 and 32) in the monkey: II. Quantitative areal and laminar distributions. *J Comp Neurol* 364:609-636.
- Gabbott PL, Dickie BG, Vaid RR, Headlam AJ, Bacon SJ (1997a) Local-circuit neurones in the medial prefrontal cortex (areas 25, 32 and 24b) in the rat: morphology and quantitative distribution. *J Comp Neurol* 377:465-499.
- Gabbott PL, Jays PR, Bacon SJ (1997b) Calretinin neurons in human medial prefrontal cortex (areas 24a,b,c, 32', and 25). *J Comp Neurol* 381:389-410.
- Garcia-Moreno F, Lopez-Mascaraque L, de Carlos JA (2008) Early telencephalic migration topographically converging in the olfactory cortex. *Cereb Cortex* 18:1239-1252.
- Gelman D, Griveau A, Dehorter N, Teissier A, Varela C, Pla R, Pierani A, Marin O (2011) A wide diversity of cortical GABAergic interneurons derives from the embryonic preoptic area. *J Neurosci* 31:16570-16580.



- Gelman DM, Marin O (2010) Generation of interneuron diversity in the mouse cerebral cortex. *Eur J Neurosci* 31:2136-2141.
- Gelman DM, Martini FJ, Nobrega-Pereira S, Pierani A, Kessaris N, Marin O (2009) The embryonic preoptic area is a novel source of cortical GABAergic interneurons. *J Neurosci* 29:9380-9389.
- Gil V, Nocentini S, Del Rio JA (2014) Historical first descriptions of Cajal-Retzius cells: from pioneer studies to current knowledge. *Front Neuroanat* 8:32.
- Gleeson JG, Walsh CA (2000) Neuronal migration disorders: from genetic diseases to developmental mechanisms. *Trends Neurosci* 23:352-359.
- Gonchar Y, Burkhalter A (1997) Three distinct families of GABAergic neurons in rat visual cortex. *Cereb Cortex* 7:347-358.
- Gonchar Y, Wang Q, Burkhalter A (2007) Multiple distinct subtypes of GABAergic neurons in mouse visual cortex identified by triple immunostaining. *Front Neuroanat* 1:3.
- Granger AJ, Mulder N, Saunders A, Sabatini BL (2016) Cotransmission of acetylcholine and GABA. *Neuropharmacology* 100:40-46.
- Gressens P (2000) Mechanisms and disturbances of neuronal migration. *Pediatr Res* 48:725-730.
- Gribnau AA, Geijsberts LG (1981) Developmental stages in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Adv Anat Embryol Cell Biol* 68:1-84.
- Gritti I, Manns ID, Mainville L, Jones BE (2003) Parvalbumin, calbindin, or calretinin in cortically projecting and GABAergic, cholinergic, or glutamatergic basal forebrain neurons of the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 458:11-31.
- Groenewegen HJ, Uylings HB (2000) The prefrontal cortex and the integration of sensory, limbic and autonomic information. *Prog Brain Res* 126:3-28.
- Grove EA, Tole S, Limon J, Yip L, Ragsdale CW (1998) The hem of the embryonic cerebral cortex is defined by the expression of multiple Wnt genes and is compromised in Gli3-deficient mice. *Development* 125:2315-2325.
- Guillemot F (2007) Spatial and temporal specification of neural fates by transcription factor codes. *Development* 134:3771-3780.
- Guillemot F, Joyner AL (1993) Dynamic expression of the murine Achaete-Scute homologue Mash-1 in the developing nervous system. *Mech Dev* 42:171-185.
- Hansen DV, Lui JH, Flandin P, Yoshikawa K, Rubenstein JL, Alvarez-Buylla A, Kriegstein AR (2013) Non-epithelial stem cells and cortical interneuron production in the human ganglionic eminences. *Nat Neurosci* 16:1576-1587.
- Hansen DV, Lui JH, Parker PR, Kriegstein AR (2010) Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature* 464:554-561.
- Haubensak W, Attardo A, Denk W, Huttner WB (2004) Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3196-3201.
- Hebert JM, Fishell G (2008) The genetics of early telencephalon patterning: some assembly required. *Nat Rev Neurosci* 9:678-685.
- Hendrickx AG, Sawyer RH (1975) Embryology of the rhesus monkey. In: *The Rhesus Monkey*, vol. 2 (Bourne, G. H., ed), pp 141-169 New York: Academic Press.
- Hendry SH, Schwark HD, Jones EG, Yan J (1987) Numbers and proportions of GABA-immunoreactive neurons in different areas of monkey cerebral cortex. *J Neurosci* 7:1503-1519.
- Heng JI, Moonen G, Nguyen L (2007) Neurotransmitters regulate cell migration in the telencephalon. *Eur J Neurosci* 26:537-546.
- Hernandez-Miranda LR, Parnavelas JG, Chiara F (2010) Molecules and mechanisms involved in the generation and migration of cortical interneurons. *ASN Neuro* 2:e00031.
- Hines M (1922) Studies in the growth and differentiation of the telencephalon in man. The fissura hippocampi. *J Comp Neurol* 34:73-171.

- Hladnik A, Džaja D, Darmopil S, Jovanov-Milošević N, Petanjek Z (2014) Spatio-temporal extension in site of origin for cortical calretinin neurons in primates. *Front Neuroanat* 8:50.
- Honig LS, Herrmann K, Shatz CJ (1996) Developmental changes revealed by immunohistochemical markers in human cerebral cortex. *Cereb Cortex* 6:794-806.
- Horton S, Meredith A, Richardson JA, Johnson JE (1999) Correct coordination of neuronal differentiation events in ventral forebrain requires the bHLH factor MASH1. *Mol Cell Neurosci* 14:355-369.
- Huang Z (2009) Molecular regulation of neuronal migration during neocortical development. *Molecular and Cellular Neuroscience* 42:11-22.
- Jakovceviski I, Mayer N, Zecevic N (2010) Multiple Origins of Human Neocortical Interneurons Are Supported by Distinct Expression of Transcription Factors. *Cereb Cortex*.
- Jimenez D, Rivera R, Lopez-Mascaraque L, De Carlos JA (2003) Origin of the cortical layer I in rodents. *Dev Neurosci* 25:105-115.
- Jinno S, Kosaka T (2000) Colocalization of parvalbumin and somatostatin-like immunoreactivity in the mouse hippocampus: Quantitative analysis with optical disector. *The Journal of Comparative Neurology* 428:377-388.
- Jones EG (1993) GABAergic neurons and their role in cortical plasticity in primates. *Cereb Cortex* 3:361-372.
- Jones EG (2009) The origins of cortical interneurons: mouse versus monkey and human. *Cereb Cortex* 19:1953-1956.
- Jovanov-Milošević N, Petanjek Z, Petrovic D, Judaš M, Kostović I (2010) Morphology, molecular phenotypes and distribution of neurons in developing human corpus callosum. *Eur J Neurosci* 32:1423-1432.
- Judaš M, Kostović I (1997) *Temelji neuroznanosti*. Zagreb: MD.
- Judaš M, Sedmak G, Kostović I (2013) The significance of the subplate for evolution and developmental plasticity of the human brain. *Front Hum Neurosci* 7:423.
- Judaš M, Šimić G, Petanjek Z, Jovanov-Milošević N, Pletikos M, Vasung L, Vukšić M, Kostović I (2011) The Zagreb Collection of human brains: a unique, versatile, but underexploited resource for the neuroscience community. *Ann N Y Acad Sci* 1225 Suppl 1:E105-130.
- Judaš M (2011) Prenatal Development of the Human Fetal Telencephalon. In: *Fetal MRI* (Prayer, D., ed), pp 81-146 Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Kadhim HJ, Gadisseux JF, Evrard P (1988) Topographical and cytological evolution of the glial phase during prenatal development of the human brain: histochemical and electron microscopic study. *J Neuropathol Exp Neurol* 47:166-188.
- Kanatani S, Yozu M, Tabata H, Nakajima K (2008) COUP-TFII is preferentially expressed in the caudal ganglionic eminence and is involved in the caudal migratory stream. *J Neurosci* 28:13582-13591.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ (2013) *Principles of neural science*. New York: McGraw-Hill.
- Kawaguchi Y, Kubota Y (1997) GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb Cortex* 7:476-486.
- Keibel F, Mall FP (1912) *Manual of Human Embryology II*. Philadelphia: J. B. Lippincott Company.
- Khazipov R, Esclapez M, Caillard O, Bernard C, Khalilov I, Tyzio R, Hirsch J, Dzhalal V, Berger B, Ben-Ari Y (2001) Early development of neuronal activity in the primate hippocampus in utero. *J Neurosci* 21:9770-9781.
- Kolasinski J, Takahashi E, Stevens AA, Benner T, Fischl B, Zollei L, Grant PE (2013) Radial and tangential neuronal migration pathways in the human fetal brain: anatomically distinct patterns of diffusion MRI coherence. *Neuroimage* 79:412-422.



- Kostović-Knežević L, Kostović I, Krmpotić-Nemanić J, Kelovic Z, Vukovic B (1978) The cortical plate of the human neocortex during the early fetal period (at 31-65 mm CRL). *Verh Anat Ges* 721-723.
- Kostović I (1990) Structural and histochemical reorganization of the human prefrontal cortex during perinatal and postnatal life. *Prog Brain Res* 85:223-239; discussion 239-240.
- Kostović I, Jovanov-Milošević N, Krsnik Z, Petanjek Z, Judaš M (2004) Laminar organization of the marginal zone in the human fetal cortex. *Neuroembryol Aging* 3:19-26.
- Kostović I, Jovanov Milošević N, Petanjek Z (2007) Neuronal migration and cortical migratory disorders. *Paediatr Croat* 51:179-190.
- Kostović I, Judaš M (1994) Prenatal and perinatal development of the human cerebral cortex. In: *Fetus as a Patient* Casterton(Kurjak, A. and Chervenak, F. A., eds), pp 35-55 Casterton: Parthenon Publishing Group.
- Kostović I, Judaš M (1995) Prenatal development of the cerebral cortex. . In: *Ultrasound and the fetal brain* (Progress in obstetric and gynecological sonography series)(Chervenak, F. A. et al., eds), pp 1-26 New York/London: The Parthenon Publishing Group.
- Kostović I, Judaš M (2002) Correlation between the sequential ingrowth of afferents and transient patterns of cortical lamination in preterm infants. *Anat Rec* 267:1-6.
- Kostović I, Judaš M (2009) Early development of neuronal circuitry of the human prefrontal cortex. In: *The cognitive neurosciences*(Gazzaniga, M. S., ed), pp 29-47 Cambridge/London: A Bradford Book, The MIT Press.
- Kostović I, Judaš M, Kostović-Knežević L, Šimić G, Delalle I, Chudy D, Sajin B, Petanjek Z (1991) Zagreb research collection of human brains for developmental neurobiologists and clinical neuroscientists. *Int J Dev Biol* 35:215-230.
- Kostović I, Judaš M, Petanjek Z (2013) Pregled morfogeneze i histogeneze krajnjeg mozga (telencefalona) u svjetlu novijih spoznaja o čovjeku specifičnim razvojnim mehanizmima. In: *Neurofiziologija fetusa i novorođenčeta, fetalno ponašanje*(Salihagic-Kadic, A. and Mejaski-Bosnjak, V., eds), pp 5-18 Zagreb: Medicinska naklada.
- Kostović I, Judaš M, Radoš M, Hrabac P (2002) Laminar organization of the human fetal cerebrum revealed by histochemical markers and magnetic resonance imaging. *Cereb Cortex* 12:536-544.
- Kostović I, Molliver ME (1974) A new interpretation of the laminar development of cerebral cortex: synaptogenesis in different layers of neopallium in the human fetus *Anat Rec* 178:395.
- Kostović I, Rakic P (1980) Cytology and time of origin of interstitial neurons in the white matter in infant and adult human and monkey telencephalon. *J Neurocytol* 9:219-242.
- Kostović I, Rakic P (1990) Developmental history of the transient subplate zone in the visual and somatosensory cortex of the macaque monkey and human brain. *J Comp Neurol* 297:441-470.
- Kostović I (1990) Zentralnervensystem. In: *Humanembryologie: Lehrbuch und Atlas der vorgeburtlichen Entwicklung des Menschen*(Hinrichsen, K. V. et al., eds), pp 381-448 Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Kostović I, Judaš M (2002) The Role of the Subplate Zone in the Structural Plasticity of the Developing Human Cerebral Cortex. *Neuroembryology and Aging* 1:145-153.
- Kostović I, Judaš M (2006) Prolonged coexistence of transient and permanent circuitry elements in the developing cerebral cortex of fetuses and preterm infants. *Developmental Medicine & Child Neurology* 48:388-393.
- Kostović I, Judaš M (2007) Transient patterns of cortical lamination during prenatal life: Do they have implications for treatment? *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 31:1157-1168.
- Kostović I, Judaš M (2010) The development of the subplate and thalamocortical connections in the human foetal brain. *Acta Pædiatrica* 99:1119-1127.

- Kostović I, Judaš M (2015) Embryonic and Fetal Development of the Human Cerebral Cortex A2 - Toga, Arthur W. In: Brain Mapping, pp 167-175 Waltham: Academic Press.
- Kostović I, Judaš M, Petanjek Z (2008) Structural development of the human prefrontal cortex. In: Handbook of developmental cognitive neuroscience (Nelson, C. A. and Luciana, M., eds), pp 213-235. Cambridge: MIT Press.
- Kriegstein A, Noctor S, Martinez-Cerdeno V (2006) Patterns of neural stem and progenitor cell division may underlie evolutionary cortical expansion. *Nature Rev Neurosci* 7:883-890.
- Krmpotić-Nemanić J, Kostović I, Vidic Z, Nemanić D, Kostović-Knežević L (1987) Development of Cajal-Retzius cells in the human auditory cortex. *Acta Otolaryngol* 103:477-480.
- Krubitzer L, Kaas J (2005) The evolution of the neocortex in mammals: how is phenotypic diversity generated? *Curr Opin Neurobiol* 15:444-453.
- Kubota Y, Hattori R, Yui Y (1994) Three distinct subpopulations of GABAergic neurons in rat frontal agranular cortex. *Brain Res* 649:159-173.
- Kubota Y, Kawaguchi Y (1994) Three classes of GABAergic interneurons in neocortex and neostriatum. *Jpn J Physiol* 44 Suppl 2:S145-148.
- Larivière K, MacEachern L, Greco V, Majchrzak G, Chiu S, Drouin G, Trudeau VL (2002) GAD65 and GAD67 Isoforms of the Glutamic Acid Decarboxylase Gene Originated Before the Divergence of Cartilaginous Fishes. *Molecular Biology and Evolution* 19:2325-2329.
- Larroche JC (1981) The marginal layer in the neocortex of a 7 week-old human embryo. A light and electron microscopic study. *Anat Embryol (Berl)* 162:301-312.
- Larroche JC, Houcine O (1982) [Neocortex in the human embryo and fetus. Electron microscopic and Golgi staining study]. *Reprod Nutr Dev* 22:163-170.
- Letinic K, Kostović I (1996a) Transient neuronal population of the internal capsule in the developing human cerebrum. *Neuroreport* 7:2159-2162.
- Letinic K, Kostović I (1996b) Transient patterns of calbindin-D28k expression in the developing striatum of man. *Neurosci Lett* 220:211-214.
- Letinic K, Kostović I (1997) Transient fetal structure, the gangliothalamic body, connects telencephalic germinal zone with all thalamic regions in the developing human brain. *J Comp Neurol* 384:373-395.
- Letinic K, Zoncu R, Rakic P (2002) Origin of GABAergic neurons in the human neocortex. *Nature* 417:645-649.
- Levitt P, Cooper ML, Rakic P (1981) Coexistence of neuronal and glial precursor cells in the cerebral ventricular zone of the fetal monkey: an ultrastructural immunoperoxidase analysis. *J Neurosci* 1:27-39.
- Levitt P, Cooper ML, Rakic P (1983) Early divergence and changing proportions of neuronal and glial precursor cells in the primate cerebral ventricular zone. *Dev Biol* 96:472-484.
- Levitt P, Rakic P (1980) Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. *J Comp Neurol* 193:815-840.
- Liu JK, Ghattas I, Liu S, Chen S, Rubenstein JL (1997) Dlx genes encode DNA-binding proteins that are expressed in an overlapping and sequential pattern during basal ganglia differentiation. *Dev Dyn* 210:498-512.
- Long JE, Cobos I, Potter GB, Rubenstein JL (2009) Dlx1&2 and Mash1 transcription factors control MGE and CGE patterning and differentiation through parallel and overlapping pathways. *Cereb Cortex* 19 Suppl 1:i96-106.
- Luskin MB, Shatz CJ (1985) Studies of the earliest generated cells of the cat's visual cortex: cogeneration of subplate and marginal zones. *J Neurosci* 5:1062-1075.



- Ma T, Wang C, Wang L, Zhou X, Tian M, Zhang Q, Zhang Y, Li J, Liu Z, Cai Y, Liu F, You Y, Chen C, Campbell K, Song H, Ma L, Rubenstein JL, Yang Z (2013) Subcortical origins of human and monkey neocortical interneurons. *Nat Neurosci* 16:1588-1597.
- Ma T, Zhang Q, Cai Y, You Y, Rubenstein JL, Yang Z (2012) A subpopulation of dorsal lateral/caudal ganglionic eminence-derived neocortical interneurons expresses the transcription factor Sp8. *Cereb Cortex* 22:2120-2130.
- Malik S, Vinukonda G, Vose LR, Diamond D, Bhimavarapu BB, Hu F, Zia MT, Hevner R, Zecevic N, Ballabh P (2013) Neurogenesis continues in the third trimester of pregnancy and is suppressed by premature birth. *J Neurosci* 33:411-423.
- Mangale VS, Hirokawa KE, Satyaki PR, Gokulchandran N, Chikbire S, Subramanian L, Shetty AS, Martynoga B, Paul J, Mai MV, Li Y, Flanagan LA, Tole S, Monuki ES (2008) Lhx2 selector activity specifies cortical identity and suppresses hippocampal organizer fate. *Science* 319:304-309.
- Marin-Padilla M (1978) Dual origin of the mammalian neocortex and evolution of the cortical plate. *Anat Embryol (Berl)* 152:109-126.
- Marin-Padilla M (1983) Structural organization of the human cerebral cortex prior to the appearance of the cortical plate. *Anat Embryol (Berl)* 168:21-40.
- Marin-Padilla M (1984) Neurons of layer I. A developmental study. In: *Cerebral cortex, vol 1: Cellular components of cerebral cortex*(Peters, A. and Jones, E. G., eds), pp 447-478 New York: Plenum Press.
- Marin-Padilla M (1988) Early ontogenesis of the human cerebral cortex. In: *Cerebral cortex, vol 7: Development and maturation of cerebral cortex*(Peters, A. and Jones, E. G., eds), pp 1-34 New York: Plenum Press.
- Marin-Padilla M (1998) Cajal-Retzius cells and the development of the neocortex. *Trends Neurosci* 21:64-71.
- Marín-Padilla M (1992) Ontogenesis of the pyramidal cell of the mammalian neocortex and developmental cytoarchitectonics: A unifying theory. *The Journal of Comparative Neurology* 321:223-240.
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C (2004) Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* 5:793-807.
- Melzer S, Michael M, Caputi A, Eliava M, Fuchs EC, Whittington MA, Monyer H (2012) Long-range-projecting GABAergic neurons modulate inhibition in hippocampus and entorhinal cortex. *Science* 335:1506-1510.
- Metin C, Alvarez C, Moudoux D, Vitalis T, Pieau C, Molnar Z (2007) Conserved pattern of tangential neuronal migration during forebrain development. *Development* 134:2815-2827.
- Metin C, Baudoin JP, Rakic S, Parnavelas JG (2006) Cell and molecular mechanisms involved in the migration of cortical interneurons. *Eur J Neurosci* 23:894-900.
- Metin C, Vallee RB, Rakic P, Bhide PG (2008) Modes and mishaps of neuronal migration in the mammalian brain. *J Neurosci* 28:11746-11752.
- Meyer G (2007) Genetic control of neuronal migrations in human cortical development. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 189:1 p preceding 1, 1-111.
- Meyer G (2010) Building a human cortex: the evolutionary differentiation of Cajal-Retzius cells and the cortical hem. *J Anat* 217:334-343.
- Meyer G, Goffinet AM (1998) Prenatal development of reelin-immunoreactive neurons in the human neocortex. *J Comp Neurol* 397:29-40.
- Meyer G, Goffinet AM, Fairen A (1999) What is a Cajal-Retzius cell? A reassessment of a classical cell type based on recent observations in the developing neocortex. *Cereb Cortex* 9:765-775.
- Meyer G, Gonzalez-Hernandez T (1993) Developmental changes in layer I of the human neocortex during prenatal life: a Dil-tracing and AChE and NADPH-d histochemistry study. *J Comp Neurol* 338:317-336.

- Meyer G, Perez-Garcia CG, Abraham H, Caput D (2002) Expression of p73 and reelin in the developing human cortex. *J Neurosci* 22:4973-4986.
- Meyer G, Schaaps JP, Moreau L, Goffinet AM (2000) Embryonic and early fetal development of the human neocortex. *J Neurosci* 20:1858-1868.
- Meyer G, Soria JM, Martinez-Galan JR, Martin-Clemente B, Fairen A (1998) Different origins and developmental histories of transient neurons in the marginal zone of the fetal and neonatal rat cortex. *J Comp Neurol* 397:493-518.
- Meyer G, Wahle P (1999) The paleocortical ventricle is the origin of reelin-expressing neurons in the marginal zone of the foetal human neocortex. *Eur J Neurosci* 11:3937-3944.
- Micheva KD, Beaulieu C (1995) Postnatal development of GABA neurons in the rat somatosensory barrel cortex: a quantitative study. *Eur J Neurosci* 7:419-430.
- Miyata T (2004) Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. *Development* 131:3133-3145.
- Miyata T, Ogawa M (2007) Twisting of Neocortical Progenitor Cells Underlies a Spring-like Mechanism for Daughter-Cell Migration. *Current Biology* 17:146-151.
- Miyoshi G, Hjerling-Leffler J, Karayannis T, Sousa VH, Butt SJ, Battiste J, Johnson JE, Machold RP, Fishell G (2010) Genetic fate mapping reveals that the caudal ganglionic eminence produces a large and diverse population of superficial cortical interneurons. *J Neurosci* 30:1582-1594.
- Mo Z (2007) Human cortical neurons originate from radial glia and neuron-restricted progenitors. *J Neurosci* 27:4132-4145.
- Mo Z, Moore AR, Filipovic R, Ogawa Y, Kazuhiro I, Antic SD, Zecevic N (2007) Human cortical neurons originate from radial glia and neuron-restricted progenitors. *J Neurosci* 27:4132-4145.
- Molliver ME, Kostović I, van der Loos H (1973) The development of synapses in cerebral cortex of the human fetus. *Brain Res* 50:403-407.
- Molnar Z, Metin C, Stoykova A, Tarabykin V, Price DJ, Francis F, Meyer G, Dehay C, Kennedy H (2006) Comparative aspects of cerebral cortical development. *Eur J Neurosci* 23:921-934.
- Monuki ES, Porter FD, Walsh CA (2001) Patterning of the dorsal telencephalon and cerebral cortex by a roof plate-Lhx2 pathway. *Neuron* 32:591-604.
- Moreno N, Gonzalez A (2011) The non-evaginated secondary prosencephalon of vertebrates. *Front Neuroanat* 5:12.
- Mrzljak L, Uylings HB, Kostović I, Van Eden CG (1988) Prenatal development of neurons in the human prefrontal cortex: I. A qualitative Golgi study. *J Comp Neurol* 271:355-386.
- Mrzljak L, Uylings HB, Kostović I, van Eden CG (1992) Prenatal development of neurons in the human prefrontal cortex. II. A quantitative Golgi study. *J Comp Neurol* 316:485-496.
- Nadarajah B, Brunstrom JE, Grutzendler J, Wong RO, Pearlman AL (2001) Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nat Neurosci* 4:143-150.
- Nemani JK, Kostović I, Nemani O (1984) Prenatal and Perinatal Development of Radial Cell Columns in the Human Auditory Cortex. *Acta Oto-Laryngologica* 97:489-495.
- Nieuwenhuys R (1994) The neocortex. An overview of its evolutionary development, structural organization and synaptology. *Anat Embryol (Berl)* 190:307-337.
- Nikolic I, Kostović I (1986) Development of the lateral amygdaloid nucleus in the human fetus: transient presence of discrete cytoarchitectonic units. *Anat Embryol (Berl)* 174:355-360.
- Nobrega-Pereira S, Kessaris N, Du T, Kimura S, Anderson SA, Marin O (2008) Postmitotic Nkx2-1 controls the migration of telencephalic interneurons by direct repression of guidance receptors. *Neuron* 59:733-745.



- Noctor SC, Martinez-Cerdeno V, Ivic L, Kriegstein AR (2004) Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci* 7:136-144.
- O'Leary DD, Chou SJ, Sahara S (2007) Area patterning of the mammalian cortex. *Neuron* 56:252-269.
- O'Rahilly R, Müller F (1981) The first appearance of the human nervous system at stage 8. *Anat Embryol (Berl)* 163:1-13.
- O'Rahilly R, Müller F (1987) Developmental stages in human embryos including revision of Streeter's horizons and a survey of Carnegie collection. Publication No. 637. Washington, D.C.: Carnegie Institution of Washington
- O'Rahilly R, Müller F (2006) The embryonic human brain. An atlas of developmental stages. New York: Wiley-Liss.
- Olivier G, Pineau H (1961) Horizons de Streeter et age embryonnaire. *Compt Rend L'Assoc Anat* 110:573-576.
- Padgett DH (1948) The development of the cranial arteries in the human embryo. *Contrib Embryol Carnegie Inst* 32:205-261.
- Padgett DH (1957) The development of the cranial venous system in man, from the viewpoint of comparative anatomy. *Contrib Embryol Carnegie Inst* 36:79-140.
- Parnavelas JG (2000) The origin and migration of cortical neurones: new vistas. *Trends Neurosci* 23:126-131.
- Parnavelas JG, Alifragis P, Nadarajah B (2002) The origin and migration of cortical neurons. *Prog Brain Res* 136:73-80.
- Pauly MC, Dobrossy MD, Nikkhah G, Winkler C, Piroth T (2013) Organization of the human fetal subpallium. *Front Neuroanat* 7:54.
- Petanjek Z, Berger B, Esclapez M (2009a) Origins of cortical GABAergic neurons in the cynomolgus monkey. *Cereb Cortex* 19:249-262.
- Petanjek Z, Dujmović A, Kostović I, Esclapez M (2008) Distinct origin of GABA-ergic neurons in forebrain of man, nonhuman primates and lower mammals. *Coll Antropol* 32 Suppl 1:9-17.
- Petanjek Z, Judaš M, Šimić G, Rasin MR, Uylings HB, Rakic P, Kostović I (2011) Extraordinary neoteny of synaptic spines in the human prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:13281-13286.
- Petanjek Z, Kostović I, Esclapez M (2009b) Primate-specific origins and migration of cortical GABAergic neurons. *Front Neuroanat* 3:26.
- Pleasure SJ, Anderson S, Hevner R, Bagri A, Marin O, Lowenstein DH, Rubenstein JL (2000) Cell migration from the ganglionic eminences is required for the development of hippocampal GABAergic interneurons. *Neuron* 28:727-740.
- Poliakov GI (1959) [On structural organization of the cortical representation of various analyzers in men]. *Vestn Akad Med Nauk SSSR* 14(9):27-36.
- Poliakov GI (1965) Development of the Cerebral Neocortex During the First Half of Intrauterine Life. pp 22-52: Nature Publishing Group.
- Ponti G, Aimar P, Bonfanti L (2006) Cellular composition and cytoarchitecture of the rabbit subventricular zone and its extensions in the forebrain. *J Comp Neurol* 498:491-507.
- Preuss TM (2009) The cognitive neuroscience of human uniqueness. In: *The cognitive neurosciences*(Gazzaniga, M. S., ed), pp 49-66 Cambridge/London: A Bradford Book, The MIT Press.
- Puelles L (2001) Thoughts on the development, structure and evolution of the mammalian and avian telencephalic pallium. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356:1583-1598.
- Puelles L, Harrison M, Paxinos G, Watson C (2013) A developmental ontology for the mammalian brain based on the prosomeric model. *Trends Neurosci* 36:570-578.
- Puelles L, Rubenstein JL (1993) Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggest a neuromeric organization. *Trends Neurosci* 16:472-479.

- Puelles L, Rubenstein JL (2003) Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends Neurosci* 26:469-476.
- Rakic P (1971) Guidance of neurons migrating to the fetal monkey neocortex. *Brain Res* 33:471-476.
- Rakic P (1972) Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol* 145:61-83.
- Rakic P (1974a) Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition. *Science* 183:425-427.
- Rakic P (1974b) Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition. *Science* 183:425-427.
- Rakic P (1988) Specification of cerebral cortical areas. *Science* 241:170-176.
- Rakic P (1995) A small step for the cell, a giant leap for mankind: a hypothesis of neocortical expansion during evolution. *Trends Neurosci* 18:383-388.
- Rakic P (2000) From Spontaneous to Induced Neurological Mutations: A Personal Witness of the Ascent of the Mouse Model. In: *Mouse Brain Development* (Goffinet, A. M. and Rakic, P., eds), pp 1-19 Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Rakic P (2002) Neurogenesis in adult primate neocortex: an evaluation of the evidence. *Nat Rev Neurosci* 3:65-71.
- Rakic P (2003a) Developmental and evolutionary adaptations of cortical radial glia. *Cereb Cortex* 13:541-549.
- Rakic P (2003b) Elusive radial glial cells: historical and evolutionary perspective. *Glia* 43:19-32.
- Rakic P (2006) A century of progress in corticoneurogenesis: from silver impregnation to genetic engineering. *Cereb Cortex* 16 Suppl 1:i3-17.
- Rakic P (2009) Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology. *Nat Rev Neurosci* 10:724-735.
- Rakic P, Arellano JI, Breunig JJ (2009a) Development of the primate cerebral cortex. In: *The cognitive neurosciences* (Gazzaniga, M. S., ed), pp 7-28 Cambridge/London: A Bradford Book, The MIT Press.
- Rakic P, Ayoub AE, Breunig JJ, Dominguez MH (2009b) Decision by division: making cortical maps. *Trends Neurosci* 32:291-301.
- Rakic P, Cameron RS, Komuro H (1994) Recognition, adhesion, transmembrane signaling and cell motility in guided neuronal migration. *Curr Opin Neurobiol* 4:63-69.
- Rakic P, Sidman RL (1968) Supravital DNA synthesis in the developing human and mouse brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 27:246-276.
- Rakic P, Sidman RL (1969) Telencephalic origin of pulvinar neurons in the fetal human brain. *Z Anat Entwicklungsgesch* 129:53-82.
- Rakic S, Zecevic N (2003a) Early oligodendrocyte progenitor cells in the human fetal telencephalon. *Glia* 41:117-127.
- Rakic S, Zecevic N (2003b) Emerging complexity of layer I in human cerebral cortex. *Cereb Cortex* 13:1072-1083.
- Riccio O, Murthy S, Szabo G, Vutskits L, Kiss JZ, Vitalis T, Lebrand C, Dayer AG (2012) New pool of cortical interneuron precursors in the early postnatal dorsal white matter. *Cereb Cortex* 22:86-98.
- Rickmann M, Wolff JR (1981) Differentiation of 'preplate' neurons in the pallium of the rat. *Bibl Anat* 142-146.
- Rogers JH (1992) Immunohistochemical markers in rat cortex: co-localization of calretinin and calbindin-D28k with neuropeptides and GABA. *Brain Res* 587:147-157.
- Ross ME, Walsh CA (2001) Human brain malformations and their lessons for neuronal migration. *Annu Rev Neurosci* 24:1041-1070.
- Rudy B, Fishell G, Lee S, Hjerling-Leffler J (2011) Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Dev Neurobiol* 71:45-61.



- Sanai N, Nguyen T, Ihrie RA, Mirzadeh Z, Tsai HH, Wong M, Gupta N, Berger MS, Huang E, Garcia-Verdugo JM, Rowitch DH, Alvarez-Buylla A (2011) Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature* 478:382-386.
- Sarnat HB (1992) Regional differentiation of the human fetal ependyma: immunocytochemical markers. *J Neuropathol Exp Neurol* 51:58-75.
- Sasaki A, Hirato J, Nakazato Y, Ishida Y (1988) Immunohistochemical study of the early human fetal brain. *Acta Neuropathol* 76:128-134.
- Sauer FC (1935) Mitosis in the neural tube. *J Comp Neurol* 62:377-405.
- Schmechel DE, Rakic P (1979a) Arrested proliferation of radial glial cells during midgestation in rhesus monkey. *Nature* 277:303-305.
- Schmechel DE, Rakic P (1979b) A Golgi study of radial glial cells in developing monkey telencephalon: morphogenesis and transformation into astrocytes. *Anat Embryol (Berl)* 156:115-152.
- Semendeferi K, Teffer K, Buxhoeveden DP, Park MS, Bludau S, Amunts K, Travis K, Buckwalter J (2011) Spatial organization of neurons in the frontal pole sets humans apart from great apes. *Cereb Cortex* 21:1485-1497.
- Shen Q (2006) The timing of cortical neurogenesis is encoded within lineages of individual progenitor cells. *Nature Neurosci* 9:743-751.
- Sherwood CC, Raghanti MA, Stimpson CD, Bonar CJ, de Sousa AA, Preuss TM, Hof PR (2007) Scaling of inhibitory interneurons in areas v1 and v2 of anthropoid primates as revealed by calcium-binding protein immunohistochemistry. *Brain Behav Evol* 69:176-195.
- Sidman RL, Rakic P (1973) Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review. *Brain Res* 62:1-35.
- Sidman RL, Rakic P (1982) *Histology and Histopathology of the Nervous System*. Nature Publishing Group.
- Silk J, Short J, Roberts J, Kusnitz J (1993) Gestation length in rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *International Journal of Primatology* 14:95-104.
- Šimić G, Mrzljak L, Fucic A, Winblad B, Lovric H, Kostović I (1999) Nucleus subputaminalis (Ayala): the still disregarded magnocellular component of the basal forebrain may be human specific and connected with the cortical speech area. *Neuroscience* 89:73-89.
- Sloviter RS (2003) Excitatory Dentate Granule Cells Normally Contain GAD and GABA, but Does That Make Them GABAergic, and Do Seizures Shift Granule Cell Function in the Inhibitory Direction? *Epilepsy Curr* 3:3-5.
- Smart IH, Dehay C, Giroud P, Berland M, Kennedy H (2002) Unique morphological features of the proliferative zones and postmitotic compartments of the neural epithelium giving rise to striate and extrastriate cortex in the monkey. *Cereb Cortex* 12:37-53.
- Spruston N (2008) Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nat Rev Neurosci* 9:206-221.
- Stagaard M, Mollgard K (1989) The developing neuroepithelium in human embryonic and fetal brain studied with vimentin-immunocytochemistry. *Anat Embryol (Berl)* 180:17-28.
- Stensaas LJ (1967) The development of hippocampal and dorsolateral pallial regions of the cerebral hemisphere in fetal rabbits. I. Fifteen millimeter stage, spongioblast morphology. *The Journal of Comparative Neurology* 129:59-69.
- Stensaas LJ (1968) The development of hippocampal and dorsolateral pallial regions of the cerebral hemisphere in fetal rabbits. *J Comp Neurol* 132:93-108.
- Stewart GR, Pearlman AL (1987) Fibronectin-like immunoreactivity in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 7:3325-3333.
- Streeter GL (1918) The developmental alterations in the vascular system of the brain of the human embryo. *Contrib Embryol Carnegie Inst* 8:5-38.
- Subramanian L, Remedios R, Shetty A, Tole S (2009) Signals from the edges: the cortical hem and antihem in telencephalic development. *Semin Cell Dev Biol* 20:712-718.

- Super H, Soriano E, Uylings HB (1998) The functions of the preplate in development and evolution of the neocortex and hippocampus. *Brain Res Brain Res Rev* 27:40-64.
- Super H, Uylings HB (2001) The early differentiation of the neocortex: a hypothesis on neocortical evolution. *Cereb Cortex* 11:1101-1109.
- Sussel L, Marin O, Kimura S, Rubenstein JL (1999) Loss of Nkx2.1 homeobox gene function results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon: evidence for a transformation of the pallidum into the striatum. *Development* 126:3359-3370.
- Takahashi T, Nowakowski RS, Caviness VS (1995) The cell cycle of the pseudostratified ventricular epithelium of the embryonic murine cerebral wall. *J Neurosci* 15:6046-6057.
- Tamamaki N, Yanagawa Y, Tomioka R, Miyazaki J, Obata K, Kaneko T (2003) Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. *J Comp Neurol* 467:60-79.
- Tan SS (2002) Developmental neurobiology: cortical liars. *Nature* 417:605-606.
- Thomson AM (2010) Neocortical layer 6, a review. *Front Neuroanat* 4:13.
- Tissir F, Goffinet AM (2003) Reelin and brain development. *Nature Rev Neurosci* 4:496-505.
- Tomioka R, Rockland KS (2007) Long-distance corticocortical GABAergic neurons in the adult monkey white and gray matter. *J Comp Neurol* 505:526-538.
- Uematsu M, Hirai Y, Karube F, Ebihara S, Kato M, Abe K, Obata K, Yoshida S, Hirabayashi M, Yanagawa Y, Kawaguchi Y (2008) Quantitative chemical composition of cortical GABAergic neurons revealed in transgenic venus-expressing rats. *Cereb Cortex* 18:315-330.
- Ulfing N (2002) Calcium-binding proteins in the human developing brain. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 165:III-IX, 1-92.
- Uylings HB, Delalle I (1997) Morphology of neuropeptide Y-immunoreactive neurons and fibers in human prefrontal cortex during prenatal and postnatal development. *J Comp Neurol* 379:523-540.
- Uylings HB, Groenewegen HJ, Kolb B (2003) Do rats have a prefrontal cortex? *Behav Brain Res* 146:3-17.
- Uylings HB, van Eden CG (1990) Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex in rat and in primates, including humans. *Prog Brain Res* 85:31-62.
- Valverde F, Facal-Valverde MV, Santacana M, Heredia M (1989) Development and differentiation of early generated cells of sublayer VIb in the somatosensory cortex of the rat: a correlated Golgi and autoradiographic study. *J Comp Neurol* 290:118-140.
- Van Brederode JF, Mulligan KA, Hendrickson AE (1990) Calcium-binding proteins as markers for subpopulations of GABAergic neurons in monkey striate cortex. *J Comp Neurol* 298:1-22.
- Van Eden CG, Mrzljak L, Voorn P, Uylings HB (1989) Prenatal development of GABA-ergic neurons in the neocortex of the rat. *J Comp Neurol* 289:213-227.
- Varju P, Katarova Z, Madarász E, Szabó G (2001) GABA signalling during development: new data and old questions. *Cell and Tissue Research* 305:239-246.
- Vercelli A, Assal F, Innocenti GM (1992) Emergence of callosally projecting neurons with stellate morphology in the visual cortex of the kitten. *Exp Brain Res* 90:346-358.
- Verney C, Derer P (1995) Cajal-Retzius neurons in human cerebral cortex at midgestation show immunoreactivity for neurofilament and calcium-binding proteins. *J Comp Neurol* 359:144-153.
- Vieira C, Pombero A, Garcia-Lopez R, Gimeno L, Echevarria D, Martinez S (2010) Molecular mechanisms controlling brain development: an overview of neuroepithelial secondary organizers. *Int J Dev Biol* 54:7-20.
- Vilmint AG, Lelievre V (2012) The medial migratory stream. *Cell Adhesion & Migration* 6:454-456.

- Vukšić M, Radoš M, Kostović I (2008) Structural basis of developmental plasticity in the corticostriatal system. *Coll Antropol* 32 Suppl 1:155-159.
- Weissman T, Noctor SC, Clinton BK, Honig LS, Kriegstein AR (2003) Neurogenic Radial Glial Cells in Reptile, Rodent and Human: from Mitosis to Migration. *Cerebral Cortex* 13:550-559.
- Wichterle H, Turnbull DH, Nery S, Fishell G, Alvarez-Buylla A (2001) In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. *Development* 128:3759-3771.
- Wilkinson M, Hume R, Strange R, Bell JE (1990) Glial and neuronal differentiation in the human fetal brain 9–23 weeks of gestation. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 16:193-204.
- Williams RS, Ferrante RJ, Caviness VS, Jr. (1978) The Golgi rapid method in clinical neuropathology: the morphologic consequences of suboptimal fixation. *J Neuropathol Exp Neurol* 37:13-33.
- Wonders C, Anderson SA (2005) Cortical interneurons and their origins. *Neuroscientist* 11:199-205.
- Wonders CP, Anderson SA (2006) The origin and specification of cortical interneurons. *Nat Rev Neurosci* 7:687-696.
- Wonders CP, Taylor L, Welagen J, Mbata IC, Xiang JZ, Anderson SA (2008) A spatial bias for the origins of interneuron subgroups within the medial ganglionic eminence. *Dev Biol* 314:127-136.
- Xu Q, Cobos I, De La Cruz E, Rubenstein JL, Anderson SA (2004) Origins of cortical interneuron subtypes. *J Neurosci* 24:2612-2622.
- Xu X, Roby KD, Callaway EM (2010) Immunochemical characterization of inhibitory mouse cortical neurons: three chemically distinct classes of inhibitory cells. *J Comp Neurol* 518:389-404.
- Yan YH, van Brederode JF, Hendrickson AE (1995) Developmental changes in calretinin expression in GABAergic and nonGABAergic neurons in monkey striate cortex. *J Comp Neurol* 363:78-92.
- Yu X, Zecevic N (2011) Dorsal radial glial cells have the potential to generate cortical interneurons in human but not in mouse brain. *J Neurosci* 31:2413-2420.
- Zaitsev AV, Gonzalez-Burgos G, Povysheva NV, Kroner S, Lewis DA, Krimer LS (2005) Localization of calcium-binding proteins in physiologically and morphologically characterized interneurons of monkey dorsolateral prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 15:1178-1186.
- Zaitsev AV, Povysheva NV, Gonzalez-Burgos G, Lewis DA (2012) Electrophysiological classes of layer 2/3 pyramidal cells in monkey prefrontal cortex. *J Neurophysiol* 108:595-609.
- Zecevic N (1998) Synaptogenesis in layer I of the human cerebral cortex in the first half of gestation. *Cereb Cortex* 8:245-252.
- Zecevic N, Chen Y, Filipovic R (2005) Contributions of cortical subventricular zone to the development of the human cerebral cortex. *J Comp Neurol* 491:109-122.
- Zecevic N, Hu F, Jakovcevski I (2011) Interneurons in the developing human neocortex. *Dev Neurobiol* 71:18-33.
- Zecevic N, Milosevic A (1997) Initial development of gamma-aminobutyric acid immunoreactivity in the human cerebral cortex. *J Comp Neurol* 380:495-506.
- Zecevic N, Milosevic A, Rakic S, Marin-Padilla M (1999) Early development and composition of the human primordial plexiform layer: An immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 412:241-254.
- Zecevic N, Rakic P (2001) Development of layer I neurons in the primate cerebral cortex. *J Neurosci* 21:5607-5619.



## 11. ŽIVOTOPIS

Ana Hladnik rođena je 27.11.1979. u Zagrebu, gdje je završila osnovnu i srednju školu. Udana je, majka dvoje djece. Diplomirala je na Medicinskom fakultetu u Zagrebu 2004. godine, među 10% najboljih studenata. Od 2005. godine zaposlena je kao znanstveni novak, kasnije asistent na Katedri za anatomiju i kliničku anatomiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu gdje sudjeluje u izvođenju nastave iz predmeta Anatomija na 4 dodiplomska kolegija s prosječnom satnicom od 600 norma sati godišnje. 2006. godine upisuje poslijediplomski studij Biomedicina i zdravstvo i počinje s radom u Laboratoriju za neuromorfometriju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga. Uže područje njenog znanstvenog djelovanja je neuroanatomija čovjeka i razvojna neurobiologija te istraživanja neuralne podloge viših kognitivnih funkcija. Pod mentorstvom prof. dr. sc. Zdravka Petanjeka 2010. godine službeno joj je prihvaćena tema doktorske disertacije pod nazivom "Tangencijalna migracija stanica telencefalona čovjeka i majmuna u ranom fetalnom razdoblju".

Ima ukupno 33 publikacije: 6 radova i 1 sažetak u časopisima indeksiranim u WoS (WoS 40 citata), 19 sažetaka na međunarodnim i domaćim znanstvenim skupovima, 2 nastavna teksta, 2 stručna teksta, 1 poglavlje u priručniku trajnog medicinskog usavršavanja, prijevod 2 poglavlja u atlasima ljudske anatomije. Dobitnica je Stipendije Grada Zagreba za uspjeh tijekom studija 2003. godine i Nagrade Zaklade prof.dr.sc. Branimir Jernej za vrijedan znanstveni rad iz područja neuroznanosti za 2014. godinu.